

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology

Бактериология · том 4 · №4 · 2019



2019 • ТОМ 4 • №4

ISSN 2500-1027

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

## Главный редактор

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

## Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.  
(Россия)

## Редакционный совет

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

## Редколлегия

Адьяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)	С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, проф. (США)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)	Т.В.Припутневич, д.м.н. (Россия)
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)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)	

## 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

117218, Москва, ул. Кржижановского, д. 31, строение 1, эт. 3

Подписано в печать 20.12.2019 г.

Отпечатано: Мастерская печати Old School,  
603105, Нижний Новгород, ул. Чачиной, 39а, оф. 5

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: +7 495 660-6004  
E-mail: reklama@phdynasty.ru

Подписной индекс по объединенному  
каталогу «Пресса России»: 39920

---

## Колонка главного редактора

Использование CRISPR-Cas-системы редактирования геномов бактериальных клеток в прикладных целях. . . . . **5**

---

## Обзорные статьи

Бактериофаги, фаговые полисахарид-деполимеразы и возможности их использования для лечения бактериальных инфекций  
*Е.В.Комисарова, В.М.Красильникова, Н.В.Воложанцев* . . . . . **7**

Передачные устройства как фактор снижения рисков при передаче патогенных биологических агентов в бактериологических лабораториях  
*Л.В.Чекан, Е.А.Тюрин* . . . . . **15**

Ренатурация рекомбинантных белков  
*Т.В.Фёдоров, Т.В.Решетняк, Е.А.Панферцев, С.Ф.Бикетов* . . . . . **19**

Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза  
*В.И.Дятлова* . . . . . **29**

Современные требования к чумным вакцинам  
*П.Х.Копылов, А.П.Анисимов* . . . . . **42**

---

## Экспериментальные статьи

Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости зоонозным кожным лейшманиозом на территории Узбекистана  
*Ж.А.Мустанов, А.С.Неъматов* . . . . . **47**

Разработка системы дот-иммуноанализа для контроля О-АГ сероваров Инаба и Огава в производстве холерной химической вакцины  
*С.А.Воробьёва, О.С.Дуракова, О.А.Волох, М.Н.Киреев, О.В.Громова, О.Д.Клокова* . . . . . **50**

---

## Страницы истории

Совет молодых ученых Ростовского-на-Дону противочумного института: яркие моменты из прошлого, современный период и взгляд в будущее  
*О.Ф.Кретенчук, Д.А.Левченко, И.А.Щипелева, А.К.Носков* . . . . . **55**

Этапы развития производства питательных сред в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии  
*Л.В.Домотенко, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин* . . . . . **61**

Правила для авторов . . . . . **68**

# 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.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)	S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)	T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.A.Davidyants, Sc.D., prof. (Armenia)	V.L.Motin, prof. (USA)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)	T.V.Priputnevich, ScD (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)	A.Rakin (Germany)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)	K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
G.A.Karimova, PhD (France)	I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (England)	A.P.Shepelin, Sc.D. (Russia)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)	E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)	V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)
Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)	

---

## 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: +7 495 660 6004; e-mail: reklama@phdynasty.ru

---

## Editor-in-Chief's Introduction

Using CRISPR-Cas-system for editing genomes of bacterial cells for applied purposes . . . . . **5**

---

## Review Articles

Bacteriophages, phage polysaccharide depolymerases and the possibility  
of their use for the treatment of bacterial infections  
*E.V.Komisarova, V.M.Krasilnikova, N.V.Volozhantsev* . . . . . **7**

Tranferring devices as a risk reduction factor in the transfer of pathogenic  
biological agents in bacteriological laboratories  
*L.V.Chekan, E.A.Tyurin* . . . . . **15**

Renaturation of recombinant proteins  
*T.V.Fedorov, T.V.Reshetnyak, E.A.Panfertsev, S.F.Biketov* . . . . . **19**

Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines  
*V.I.Dyatlova* . . . . . **29**

Modern requirements for plague vaccines  
*P.Kh.Kopylov, A.P.Anisimov* . . . . . **42**

---

## Experimental Articles

Retrospective epidemiological analysis of the leishmaniasis in Uzbekistan  
*Zh.A.Mustanov, A.S.Nematov* . . . . . **47**

Development of the dot immuno analysis system for control of the serobar specific  
O-antigens Inaba and Ogava in the production of cholera chemical vaccine  
*S.A.Vorobyova, O.S.Durakova, O.A.Volokh, M.N.Kireev, O.V.Gromova, O.D.Klokova* . . . . . **50**

---

## Pages of History

The council of young scientists of the Rostov-on-Don Antiplaque Institute:  
bright moments from the past, our present and prosppection  
*O.F.Kretenchuk, D.A.Levchenko, I.A.Shchipeleva, A.K.Noskov* . . . . . **55**

Stages of development of nutrient media production at the State Research Center  
of Applied Microbiology and Biotechnology  
*L.V.Domotenko, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin* . . . . . **61**

Instructions for Authors . . . . . **68**

# Использование CRISPR-Cas-системы редактирования геномов бактериальных клеток в прикладных целях\*

**Б**урное развитие направления исследований, связанного с геномным редактированием, привело к созданию ряда эффективных методологий, позволяющих конструировать биологические объекты с новыми, полезными для человека свойствами, которые все чаще находят свое применение в биологии, медицине, аграрном секторе и промышленности.

Целью геномного редактирования является модификация отдельных участков геномов бактерий, что позволяет исследовать генетику, лежащую в основе метаболических особенностей бактерий, и модифицировать их геном для последующего использования в прикладных целях.

Редактирование геномов бактерий основано на использовании программируемых нуклеаз из систем CRISPR-Cas, прежде всего нуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (spCas9), которые в комплексе с направляющей (гидовой) РНК (гРНК) распознают мишень ДНК. Матрица для рекомбинации обычно представлена последовательностью, которая содержит модификации сайта-мишени, а также фланкирующие участки ДНК. Разрыв ДНК неотредактированных мишеней нуклеазами CRISPR-Cas-системы чаще всего приводит к гибели бактериальных клеток, что позволяет фактически использовать этот феномен для селекции тех бактерий, у которых произошла рекомбинация.

Существует достаточно большой спектр используемых методических подходов для редактирования геномов, которые могут быть отнесены к одной из трех различных стратегий, а выбор каждой из них обусловлен типом матрицы, используемой для рекомбинации.

Одна из стратегий связана с использованием линейной ДНК в качестве матрицы для рекомбинации, а также гетерологичной ДНК-рекомбиназы фагового происхождения. Данная методология подразумевает первоначальную трансформацию плазмиды, содержащей систему для осуществления рекомбинации, затем индукцию экспрессии рекомбиназы и, наконец, совместную трансформацию линейной матрицы ДНК и плазмиды или нескольких плазмид, кодирующих CRISPR-нуклеазы и гидовую РНК. В исследовательской практике используются несколько рекомбиназ, например фермент системы X-Red или рекомбиназа RecT, которая должна быть получена только из родственных для бактерии фагов.

Следующая стратегия подразумевает использование в качестве матрицы для рекомбинации плазмидную ДНК. При этом матрица для осуществления рекомбинации содер-



жится либо на той же плазмиде, что и система CRISPR-Cas, либо на отдельной плазмиде. Для осуществления рекомбинации могут быть использованы как гетерологичные рекомбиназы, так и собственные механизмы рекомбинации бактериальных клеток. К настоящему времени с использованием плазмидой матрицы без гетерологичной рекомбиназы исследователям удалось успешно провести редактирование геномов таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, а также родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*. Использование эндогенного механизма для гомологичной рекомбинации упрощает процесс редактирования, так как для этого требуется использование только одного или двух плазмидных векторов, содержащих матрицу для редактирования и систему CRISPR-Cas. Однако этот механизм может отсутствовать или быть недостаточно активен у некоторых бактерий, что потребует идентификации рекомбиназ, функционирующих у конкретного вида бактерий.

Существует стратегия для редактирования на основе CRISPR-Cas, основанная на модификации геномов путем негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) – основного способа репарации двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных системой CRISPR-Cas. Такой способ может быть особенно полезным при введении мутаций, обуславливающих снижение жизнеспособности клетки. У бактерий NHEJ зависит от двух белков – Ku и LigD, действие которых часто приводит к неспецифическим мутациям, вставкам или делециям. Следует иметь в виду, что только четверть прокариот, по различным оценкам, кодируют белки Ku и гиперэкспрессия генов *UgD* и *Ku* может быть цитотоксична для бактерий, что приводит к мутациям вне мишени из-за репарации спонтанных разрывов двухцепочечной ДНК. Оценка этой мето-

\*На основе обзорных материалов сотрудников Центра геномных исследований мирового уровня по биологической безопасности А.В.Поповой, В.А.Баннова и Д.Ю.Гущина.

дологии говорит о том, что необходимы дополнительные исследования, использующие данную стратегию для полной реализации ее потенциала в отношении редактирования бактериальных геномов.

Необходимо отметить, что в настоящее время не существует преобладающей стратегии по редактированию бактериальных геномов и выбор методологии зависит от непосредственно поставленной исследовательской задачи, целевого местоположения мутаций и используемого штамма.

Одной из первых, хорошо охарактеризованных одно-субъединичных эффекторных нуклеаз с относительно простой последовательностью PAM (protospacer adjacent motif, конститутивная часть мишени ДНК, короткая последовательность из 2–5 нуклеотидов, прилегающая к протоспейсеру) и стабильной экспрессией в клетках различных организмов является *spCas9*. Однако избыточная экспрессия *spCas9* может быть цитотоксичной для бактериальных клеток, что создает потенциальный барьер для широкого использования данной нуклеазы с целью геномного редактирования.

В настоящее время рассматривается несколько подходов для решения проблемы цитотоксичности *spCas9*. Одним из них является использование индуцибельных систем экспрессии *spCas9*, чтобы гарантировать отсутствие мишень-зависимой гибели клетки в отсутствие индуктора. В случае мутации одного из каталитических остатков *spCas9* нуклеаза становится способной разрезать только одну нить ДНК. При использовании *Cas9*-«никазы» (*nCas9*) было показано эффективное редактирование генома в тех случаях, когда использование *spCas9* не приводило к необходимому результату. Однако на сегодняшний день требуется проведение дополнительных исследований, чтобы понять механизм редактирования генома с помощью *nCas9* и исследовать возможности по улучшению редактирования с ее использованием. Одной из альтернатив *spCas9* является использование нуклеазы CRISPR типа V-A *CasI2a*, которая может являться удобным инструментом для эффективного геномного редактирования на основе CRISPR-Cas, хотя необходимо проведение дополнительных исследований для более полного понимания преимуществ и ограничений использования данной нуклеазы.

Недавно разработан альтернативный подход для редактирования геномов на основе использования модифицированных нуклеаз CRISPR-Cas, называемых редакторами основа-

ний. Редакторы оснований, как правило, содержат химеры *dCas9* или *nCas9* и домены цитидин-деаминазы и преобразуют цитидины в урацилы на нецелевой цепи в определенном участке рядом с PAM. Редакторы оснований были использованы для редактирования бактериальных геномов *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Clostridium beijerinckii* с целью внесения точечных мутаций. Метод с использованием редакторов оснований достаточно прост, поскольку он требует трансформации только одной плазмиды, содержащей модифицированную нуклеазу CRISPR и rPHK.

Таким образом, для осуществления редактирования генома бактерий с помощью системы CRISPR-Cas эффективность трансформации в культивируемом штамме должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить доставку как компонентов CRISPR-Cas, так и компонентов, необходимых для гомологичной рекомбинации. В связи с этим разработка более эффективных рекомбиназ, а также регулируемых промоторов в интересующем штамме является важной задачей, решение которой будет способствовать повышению эффективности геномного редактирования.

Для возбудителей бактериальных инфекций из группы особо опасных системы генетического редактирования, позволяющие получать штаммы с новыми, важными для иммунопрофилактики свойствами, еще недостаточно хорошо разработаны. Это еще предстоит сделать на основе детального изучения генетических особенностей возбудителей и применимости к ним технологий на основе CRISPR-Cas-редактирования в различных вариантах. Важной задачей в этой сфере является также обеспечение возможности разработки на основе современных генетических подходов, описанных выше, новых методологий достоверной элиминации опасных возбудителей из организма человека, пребывающих в активном или dormantном состоянии, что является одной из ключевых задач при обеспечении биологической безопасности.

*Руководитель Центра геномных исследований  
мирового уровня по обеспечению биологической  
безопасности и технологической независимости,  
Директор ФБУН «Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора,  
академик РАН И.А.Дятлов*

# Бактериофаги, фаговые полисахарид-деполимеразы и возможности их использования для лечения бактериальных инфекций

Е.В.Комисарова, В.М.Красильникова, Н.В.Воложанцев

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

Разработка альтернативных способов лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями, является одним из приоритетных направлений современной биомедицины. В публикациях по клинической, прикладной и фундаментальной микробиологии последних 10 лет наблюдается повышенный интерес к бактериофагам и их использованию для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Исследование бактериофагов на современном научном уровне способствует обнаружению дополнительных средств для борьбы с патогенными бактериями. Одним из актуальных направлений исследований является изучение фаговых полисахарид-деполимеризующих ферментов, участвующих в стадии адсорбции литических фагов на бактериальных клетках. Изучение механизмов взаимодействия между фагом и бактериальной клеткой на этапе деполимеризации поверхностных полисахаридов позволяет открыть новые возможности как в борьбе с бактериальными патогенами, так и в применении этих знаний в различных направлениях микробиологических технологий.

**Ключевые слова:** бактериофаг, полисахарид-деполимераза, капсульные полисахариды, фаготерапия

**Для цитирования:** Комисарова Е.В., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В. Бактериофаги, фаговые полисахарид-деполимеразы и возможности их использования для лечения бактериальных инфекций. Бактериология. 2019; 4(4): 7–14. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-7-14

## Bacteriophages, phage polysaccharide depolymerases and the possibility of their use for the treatment of bacterial infections

E.V.Komisarova, V.M.Krasilnikova, N.V.Volozhantsev

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

The development of alternative methods of treating infections caused by antibiotic-resistant bacteria is one of the priority areas of modern biomedicine. In publications on clinical, applied and fundamental microbiology of the last 10 years, there is an increased interest in bacteriophages and their use for the treatment and prevention of infectious diseases. The study of bacteriophages at the modern scientific level helps to detect additional means to combat pathogenic bacteria. One of the current research directions is the study of phage polysaccharide-depolymerizing enzymes involved in the adsorption of lytic phages on bacterial cells. Studying the mechanisms of interaction between the phage and the bacterial cell at the stage of depolymerization of surface polysaccharides allows us to discover new opportunities both in the fight against bacterial pathogens and in the application of this knowledge in various areas of microbiological technologies.

**Keywords:** bacteriophage, polysaccharide depolymerase, capsular polysaccharides, phage therapy

**For citation:** Komisarova E.V., Krasilnikova V.M., Volozhantsev N.V. Bacteriophages, phage polysaccharide depolymerases and the possibility of their use for the treatment of bacterial infections. Bacteriology. 2019; 4(4): 7–14. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-7-14

### Для корреспонденции:

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, п. Оболенск, Московская область, ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0147

E-mail: nikvol@obolensk.org

Статья поступила 27.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Nikolay V. Volozhantsev, PhD (Biology), leading researcher, laboratory of molecular diagnostics and genetic engineering preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0147

E-mail: nikvol@obolensk.org

The article was received 27.11.2019, accepted for publication 20.12.2019



**Б**актериофаги (фаги) представляют собой вирусы, инфицирующие бактерии. Фаги являются не только самой многочисленной и разнообразной группой вирусов, но и одним из наиболее распространенных биологических объектов на Земле. Фаги убиквитарны в окружающей среде и в изобилии обнаруживаются там, где существуют развитые бактериальные сообщества. Примерами таких ниш могут служить океан, почва, очистные сооружения, горячие источники и живые организмы [1, 2].

Бактериофаги, как и прочие вирусы, являются самореплицирующимися облигатными паразитами. При нахождении во внеклеточной среде они обычно биохимически инертны. Эти вирусы представляют собой частицы, содержащие нуклеиновую кислоту (ДНК либо РНК), которая кодирует информацию, необходимую для их репликации. Вирусные геномы являются либо кольцевыми, либо линейными, одно- или двухцепочечными. Размер генома фагов варьирует от ~3,3 тыс. нуклеотидов (оцРНК фагов *Escherichia coli*) [3] до почти 500 тыс. п.н. (бактериофаг G, инфицирующий *Bacillus megaterium*) [4].

Одной из самых ярких особенностей генома бактериофагов является «мозаичность», обусловленная горизонтальным переносом генов [5]. По сути, каждый фаговый геном можно рассматривать как уникальное сочетание модулей, которыми фаги могут обмениваться внутри популяции. Размер модулей и уровень их конверсии сильно отличается среди фагов с различной морфологией, размером и кругом хозяев [6]. Число фаговых геномов, доступных для сравнительного анализа, постоянно растет, и степень их мозаичности становится все более очевидной и поразительной.

Популяция фагов представляет собой обширный резервуар неисследованного генетического разнообразия, поскольку до 80% генов, содержащихся в фаговых геномах, кодирует гипотетические протеины, функции которых не известны. Мозаичная структура генома фагов обеспечивает высокий уровень их адаптивности и, как следствие, эволюционный успех. В естественных местах обитания фаги и бактерии находятся в постоянной «гонке вооружений», выражающейся в непрерывных циклах коэволюции. Бактериальные клетки обладают множеством различных систем защиты от фаговой инфекции [7, 8]. В свою очередь, фаги способны противостоять данным механизмам устойчивости за счет пластичности генома и высокой скорости воспроизведения [9, 10].

Каждый фаг специфичен для конкретного бактериального хозяина и может иметь узкий или широкий диапазон хозяев в зависимости от его способности к инфицированию. Клетка-хозяин обеспечивает ферментативный аппарат для репликации фагов и их размножения [11]. Жизненный цикл фага может проходить по двум направлениям: литическому и лизогенному. При реализации литического пути фаг вводит нуклеиновую кислоту в клетку и размножается путем подчинения ее репликативного аппарата. После этапа сборки вирусных частиц фаговое потомство разрушает клетку, обеспечивая себе выход в окружающую среду. Лизогенный путь подразумевает интеграцию и дальнейшую репликацию фагового генетического материала в составе бактериального генома. При таком варианте бактериофаг может либо неограниченное время находиться в геноме бактерии и пе-

редаваться при делении клетки следующему поколению, либо выщепляться из генома и размножаться по литическому пути [12].

Различные сценарии взаимодействия между фагом и бактериальной клеткой играют важную роль в биогеохимических циклах, регуляции структур микробных сообществ и управлении микробными популяциями. Например, заражение бактериальной клетки лизогенным фагом может способствовать увеличению микробного разнообразия в результате горизонтального переноса генов [13]. Литическая фаговая инфекция приводит к лизису клетки-хозяина и, как следствие, обеспечивает контроль популяции клеток [14]. Бактериальный дебрис, образующийся в результате лизиса, поступает в пищевую сеть и биогеохимические циклы, в результате чего происходит рециркуляция питательных веществ в экосистеме [13].

### **Хвостатые бактериофаги порядка *Caudovirales***

Среди всех бактериальных вирусов фаги порядка *Caudovirales* (от лат. cauda – хвост) являются самыми распространенными [13]. Считается, что хвостатые фаги возникли в раннюю докембрийскую эру и, скорее всего, эволюционировали от общего предка [15]. По различным оценкам, количество отдельных вирионов хвостатых фагов на Земле составляет более  $10^{30}$  [16]. В водных экосистемах, где доминируют бактерии, подавляющее большинство вирусоподобных частиц напоминает хвостатые фаги [16]. По данным Ackermann и Prangishvili (2012), более 90% из 6200 фагов, исследованных с помощью электронной микроскопии, представляют собой фаги порядка *Caudovirales* [17]. В настоящее время каудовирусы являются наиболее изученными вирусами бактерий. Среди всех секвенированных фаговых геномов более 95% представлено геномами хвостатых фагов.

Бактериофаги порядка *Caudovirales* чрезвычайно разнообразны, но, тем не менее, объединены двумя характерными чертами: все они имеют хвостовые отростки и используют общий механизм упаковки ДНК в капсид [18]. На основании морфологии хвостового отростка представители порядка *Caudovirales* подразделяются на три семейства – *Myoviridae* (длинный сокращающийся хвост), *Siphoviridae* (длинный несокращающийся хвост) и *Podoviridae* (короткий несокращающийся хвост). В 2017 г. Подкомитет по вирусам бактерий и архей ICTV анонсировал появление нового семейства хвостатых бактериофагов, сформированное на основании анализа данных полногеномного секвенирования бактериофагов и названное в честь Ханса-Вольфганга Аккерманна – *Ackermannviridae* [19].

Геном бактериофагов порядка *Caudovirales* представлен одной несегментированной линейной молекулой дцДНК, которая иногда может приобретать кольцевую форму. Геном может содержать от 12 до 500 тыс. п. н., кодирующих структурные, регуляторные и ферментативные белки (Brüssow, 2002). Геном упакован в изометрический икосаэдрический капсид, к одной из вершин которого прикреплен хвостовой отросток [20].

С резким увеличением числа охарактеризованных хвостатых фагов становится все более очевидным, что порядок *Caudovirales* больше не способен объединять огромное гене-

тическое разнообразие данной вирусной группы [21] и должен быть надлежащим образом реорганизован. Проблемы таксономии порядка *Caudovirales* побудили ICTV изучить возможность введения дополнительных таксономических уровней. Первоначальные идеи и планы были представлены на конференции Европейской организации молекулярной биологии (European Molecular Biology Organization, EMBO) 2016 г. «Вирусы микробов IV» (Ливерпуль, Великобритания). В настоящее время Подкомитет по бактериальным и архейным вирусам изучает согласованность порядка *Caudovirales* на примере группы разнообразных фагов, которые классифицированы как представители подсемейства *Spounavirinae* [22].

Взаимодействие литического бактериофага и бактериальной клетки является многостадийным процессом: сначала происходит адсорбция бактериофага на поверхности бактериальной клетки, затем введение нуклеиновой кислоты фага в клетку, внутриклеточный синтез компонентов фага и его сборка и, наконец, лизис бактериальной клетки с высвобождением новых фаговых частиц.

Хвостовые отростки являются высокоспецифичными системами для распознавания клетки-хозяина и используются фагами для прикрепления к поверхности бактерии. Структурный состав хвостового отростка может варьировать от единичного хвостового шипа до более сложного комплекса, включающего базальную пластинку с дополнительными элементами в виде хвостовых волокон (tail-fiber) и хвостовых шипов (tail-spike) [20]. Гены, кодирующие структурные элементы хвостового отростка, являются наиболее варибельной частью фагового генома [6]. Хвостовые белки фагов разнообразны и способны распознавать почти каждый компонент поверхности клетки хозяина, включая белки, полисахариды (ПС) и липополисахариды (ЛПС) [23].

Процесс адсорбции бактериофага на поверхности бактериальной клетки включает два этапа: обратимое и необратимое связывание. Следует уточнить, что молекулярные механизмы обоих этапов могут существенно различаться для различных систем «фаг–бактериальная клетка», а также варьировать среди представителей различных таксономических групп фагов и их бактериальных хозяев. Способность бактериофага инфицировать ограниченный круг хозяев продиктована спецификой адсорбционного процесса, зависящего от природы и структурных особенностей рецепторов на поверхности бактериальной клетки. Важную роль играет локализация, количество и плотность рецепторов на различных участках клеточной поверхности. Природа рецепторов различна для разных представителей таксономических групп бактерий и в основном определяется составом клеточной стенки и поверхностными структурами [24].

Как известно, структуры клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий значительно отличаются. Два основных отличия: высокая проницаемость за счет большого количества интегральных белков, формирующих каналы (более 20 тыс. на клетку) [25], и наличие внешнего липополисахаридного слоя. Белки, локализованные на мембране бактериальной клетки, а также различные участки ЛПС могут служить в качестве рецепторов для бактериофагов. В большинстве случаев фаги требуют наличия двух типов рецепторов [24]. Некоторые бактерии экранируют ре-

цепторы за счет синтеза углеводных барьеров, прилегающих к клетке – капсульных полисахаридов (КПС) или слизистых экстраклеточных полисахаридов (ЭПС) [26]. КПС и ЭПС отличаются огромным разнообразием в своем составе не только среди бактерий одного рода, но и внутри вида. Кроме того, их состав может варьировать в зависимости от условий культивирования бактерий [27]. Капсула обычно играет роль первичного рецептора на начальном этапе присоединения бактериофага (стадия обратимой адсорбции), в то время как белки и ЛПС чаще всего обеспечивают необратимую адсорбцию бактериофага [27].

Для преодоления углеводного барьера бактерий фаги используют полисахарид-деградирующие ферменты, которые распознают, связывают и расщепляют полисахаридные соединения, обеспечивая доступ к первоначально недоступному рецептору клеточной поверхности бактерий [27]. Визуально это проявляется как особенность морфологии негативных колоний (НК) бактериофагов, лизирующих инкапсулированные штаммы бактерий, – вокруг НК образуется ореол (halo), увеличивающийся в диаметре при инкубации, в то время как размер НК остается постоянным. Этот морфологический признак, формирующийся за счет действия фаговых ПС-деполимераз, впервые был описан V.Sertic в 1929 г. [28]. S.Humphries (1948) первым выделил подобный фермент при работе с клебсиеллезным бактериофагом MA8 [29].

#### Фаговые полисахарид-деполимеразы

В результате тесной коэволюции бактериофагов и их бактерий-хозяев сформировалось большое разнообразие полисахаридных компонентов клеточных стенок бактерий. Это подразумевает наличие у фагов такого же разнообразия структурных элементов, обеспечивающих первичное взаимодействие с бактериальной клеткой. Именно в генах фагов, кодирующих рецептор-связывающие белки (в т.ч. ПС-деполимеразы), наблюдается наивысший уровень разнообразия и мозаичности, что отражает влияние интенсивного вертикального и горизонтального переноса генов на эволюцию этих структур [30].

Несмотря на большое разнообразие ферментативной специфичности, ПС-деполимеразы имеют общие структурные особенности. Они являются фибриллярными белками с параллельной  $\beta$ -складчатой топологией [31] и, как правило, образуют удлинённые гомотримеры, по форме напоминающие шип. Такая конфигурация позволяет расширить активный сайт для распознавания и связывания рецепторов, скрытых в поверхностных полисахаридах. Однако существуют исключения – эндосиалидаза, кодируемая сифофагом *E. coli* 63D, является гомотетрамером [32].

Сложная  $\beta$ -складчатая структура определяет специфичность и стабильность ПС-деполимераз. Высокий уровень стабильности соответствует жестким внешним условиям, которые эти белки должны выдерживать в различных средах, чтобы противостоять денатурирующим агентам [33, 34].

Общая архитектура ПС-деполимераз чаще всего включает три домена: N-концевой, центральный и C-концевой. Небольшой N-концевой домен обеспечивает присоединение ПС-деполимеразы к хвостовым структурам бактериофага. Рядом исследований показано, что N-концевой домен не

требуется для правильной сборки и ферментативной активности ПС-деполимеразы [35]. Крупный центральный домен является ключевым для распознавания бактериальной клетки, а также обладает ферментативной активностью. С-концевой домен ответственен за тримеризацию белка и в основном работает как внутримолекулярный шаперон. Многие исследователи считают, что С-концевой домен ответственен также за распознавание клеточного рецептора [31, 34]. N-концевой, а также С-концевой домены ПС-деполимераз консервативны среди фагов, принадлежащих к одной таксономической группе, в то время как специфичный для клетки-хозяина центральный домен является вариабельным, обеспечивая тем самым изменение диапазона хозяев или адаптацию к новой среде [36].

Подавляющее большинство фаговых ПС-деполимераз входит в состав структурных компонентов фаговой частицы – в основном это белки хвостового аппарата [37], реже – белки волокнистых структур коннектора, соединяющего хвостовой отросток и капсид [38]. Связанные с вирионами ПС-деполимеразы необходимы на этапе первичного взаимодействия фагов с бактериальными клетками, окруженными КПС и/или ЭПС.

По механизму ферментативного действия фаговые ПС-деполимеразы разделяются на два основных класса – гидролазы (КФ3) и лиазы (КФ4). Оба класса ферментов расщепляют полисахариды на растворимые олигосахариды, что приводит к разрушению углеводного барьера бактериальной клетки. Большинство гидролаз принадлежит к группе О-гликозил-гидролаз, которые используют молекулу воды для расщепления О-гликозидных связей в молекулах полисахаридов. Эта группа объединяет сиалидазы (нейраминидазы) [39], рамнозидазы [40], леваназы, ксиланазы и декстраназы [37]. ПС-деполимеразы, принадлежащие к классу лиаз, расщепляют гликозидную связь по механизму β-элиминации с сопутствующим образованием двойной связи без использования молекулы воды. Эта группа объединяет гиалуронидазы [41], пектат/пектин-лиазы [33], альгинат-лиазы [42] и специфическую К5-лиазу [43].

#### **Использование бактериофагов и фаговых ферментов для контроля бактериальных инфекций**

Благодаря энтузиазму Феликса Д'Эрелля бактериофаги практически сразу после обнаружения стали использоваться в терапевтических целях. В первых опытах, проведенных Д'Эреллем на себе, бактериофаги показали себя как весьма перспективное средство для борьбы с инфекционными заболеваниями. Первая фаготерапия людей была предпринята Д'Эреллем в 1919 г. [44], а первый отчет о клиническом применении бактериофагов был опубликован в 1921 г. [45]. Несмотря на многообещающие успехи первых испытаний бактериофагов, плохой контроль исследований и противоречивые результаты породили в научном сообществе разногласия относительно эффективности фаготерапии в отношении бактериальных инфекций [46]. Исследования проводились по схемам, не соответствующим принятым на сегодня протоколам клинических испытаний, а также не были должным образом документированы и описаны в научной литературе. С появлением антибиотиков интерес к фагам на Западе был утрачен [47], исследования по фаготерапии,

проводимые западными специалистами, были приостановлены. Тем не менее в Советском союзе и некоторых странах Восточной Европы исследования по фаготерапии не прекращались [48–51].

Антибиотики, безусловно, способствовали значительному успеху в лечении инфекционных заболеваний и улучшении здоровья человека, но к концу XX века «золотая эра» открытия новых антибактериальных веществ закончилась, и современные исследователи сосредоточились на модификации существующих препаратов [52]. Появление множества устойчивых бактерий сделало большинство антимикробных препаратов малоэффективными. Возникшая ситуация усугубляется в связи с бесконтрольным потреблением антибиотиков, особенно в странах БРИКС (Бразилия, Россия, Индия, Китай, ЮАР) [53]. Эти проблемы способствовали возрождению интереса к изучению бактериофагов и возможности их использования в качестве антибактериальных препаратов [54]. В многочисленных исследованиях было подтверждено, что бактериофаги обладают противомикробным потенциалом в отношении множественно устойчивых бактерий как *in vitro* [55, 56], так и *in vivo* [57, 58].

В контексте оценки положительных и отрицательных сторон применения бактериофагов в терапии инфекционных заболеваний самым противоречивым свойством фагов является высокая степень специфичности к определенным видам или штаммам бактерий. С одной стороны, это свойство обеспечивает положительный эффект фаготерапии – бактериофаги, в отличие от антибиотиков, меньше воздействуют на нормофлору [59]. С другой стороны, оно же является лимитирующим фактором – один тип фага не может инфицировать все штаммы бактерий в пределах вида. Поэтому для элиминации широкого спектра бактерий требуются «коктейли» из нескольких типов фагов. Одним из очевидных минусов фаготерапии является единовременный массивный лизис бактерий и высвобождение их компонентов, что может привести к нежелательным иммунным реакциям [60]. Не стоит также забывать о том, что бактерии постоянно вырабатывают механизмы резистентности к инфицированию фагами [7, 8] – преодоление этого ограничения возможно благодаря целенаправленной генетической модификации бактериофагов [61]. Постоянный рост баз данных нуклеотидных последовательностей фаговых геномов, исследования структурных особенностей фагов, а также взаимодействия фагов и бактерий способствуют созданию модифицированных фагов и их компонентов [4, 40]. Следует упомянуть, что такие свойства бактериофагов, как самовоспроизводимость, относительная легкость и быстрота процесса их производства являются несомненными преимуществами по сравнению с антибактериальными химиопрепаратами [59]. Однако ввиду высокого разнообразия структуры, жизненного цикла и способа организации генома фагов серьезной проблемой представляется получение одобрения регуляторных органов для применения препаратов бактериофагов в клинической практике [59, 62].

Тем не менее медицинские продукты на основе фагов постепенно получают все большее признание. В рамках проекта «PhagoBurn» семь медицинских центров Франции, Бельгии и Швейцарии проводят клинические испытания, призванные оценить эффективность местного применения

специализированного коктейля бактериофагов для профилактики и терапии инфекций, вызванных *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* у пациентов с ожогами. При применении данного коктейля не было выявлено никаких побочных эффектов или осложнений [63]. Также не было обнаружено побочных эффектов приема фага T4 в исследовании по оценке безопасности фаговой терапии, описанном Bruttin и Brüssow (2005), в котором 15 здоровых волонтеров принимали фаг перорально [64]. Об испытаниях собственных оригинальных коктейлей фагов для лечения широкого спектра заболеваний сообщает ряд американских фирм (Intralytix, Enbiotix, AmpliPhi) [65, 66].

Самое масштабное на сегодня производство бактериофагов для применения в медицине располагается в Российской Федерации. Широкий спектр фаговых препаратов выпускает АО «НПО Микроген» (<http://www.bacteriophage.ru/>). Терапевтические бактериофаги производятся также в Международном центре фаготерапии им. Г.Элиавы (Тбилиси, Грузия), где расположено не только промышленное производство, но и клиника с обширной коллекцией бактериофагов (<http://www.eliava-institute.org/>). В рамках программы медицинского туризма с этим центром сотрудничают клиники стран Европы и США. В Центре фаготерапии при Институте иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук препараты бактериофагов разрабатываются для экспериментального клинического применения (<https://www.iitd.pan.wroc.pl/en/OTF/>). Например, исследования по использованию бактериофагов против бактерий рода *Klebsiella* в Польше показали, что фаготерапия может быть успешно применена при лечении септических [67] и кожных инфекций [68], а также цереброспинального менингита [69], этиологическим агентом которых являлась *K. pneumoniae*.

Достижения в области молекулярной биологии, лучшее понимание биологии и генетики бактериофагов позволило раскрыть их потенциал не только при лечении инфекционных заболеваний человека, но и в других областях клинической и эпидемиологической деятельности. Бактериофаги используются для детекции и типирования бактерий [70], дезинфекции медицинских изделий, контроля инфекций животных и растений [71], обеззараживания пищевых продуктов [72]. Разработаны несколько препаратов на основе природных фагов, одобренных для обеззараживания пищевых продуктов, – это такие препараты, как ListShield, EcoShield и SalmoFresh (компания Intralytix, США), созданные для контроля соответствующих патогенных бактерий – *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 и *Salmonella enterica* в продуктах питания или на объектах пищевой промышленности (<http://www.intralytix.com/index.php?page=prod>). Препарат AgriPhage от компании OmniLytics (США) выявляет наличие *Xanthomonas campestris* и *Pseudomonas syringae* на овощах (<http://www.omnilytics.com/>). Препарат Listex P100 от компании Micreos (Нидерланды) снижает обсемененность пищевых продуктов листериями [73].

Относительно недавно в качестве самостоятельных антимикробных препаратов предложены различные фаговые ферменты [74, 75]. Например, фаговые эндолизины – ферменты, необходимые для расщепления клеточной стенки бактерий. Эндолизины успешно прошли испытания на раз-

личных моделях животных, показав ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками при лечении экспериментальных инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, устойчивыми к антимикробным препаратам [74].

Другая перспективная группа фаговых ферментов – ПС-деполимеразы с их уникальной способностью специфически распознавать и расщеплять КПС и ЭПС бактерий. Большинство этих белков, в отличие от фаговых эндолизинов, не обладают бактерицидной активностью, но, тем не менее, рассматриваются как потенциальное средство для снижения вирулентных свойств бактерий [33]. Потеря или нарушение поверхностных структур, используемых многими патогенами для повышения степени вирулентности, колонизации и формирования биопленки, делает бактерии менее вирулентными и/или чувствительными к антимикробным препаратам и к факторам защиты организма хозяина (фагоцитоз или действие системы комплемента) [75, 76]. Терапевтическая эффективность рекомбинантных ПС-деполимераз, которые только модифицируют фенотип бактериальных клеток, не влияя на их жизнеспособность и скорость роста, была подтверждена на лабораторных моделях *in vivo* [33, 75, 76].

Интенсивные исследования, проводимые в настоящее время различными группами, сосредоточены на перспективах применения ПС-деполимераз, выделяемых бактериофагами *Klebsiella* [77–79]. Hsu et al. (2013) сообщают об идентификации KN2-специфического фага и его ПС-деполимеразы, которая может быть использована для лечения инфекций *K. pneumoniae*, а также для капсульного типирования [39]. В исследовании Lin et al. (2014) был выделен и охарактеризован бактериофаг NTUH-K2044-K1-1, специфически лизирующий штаммы *K. pneumoniae* капсульного типа K1, а также клонирован ген, кодирующий ПС-деполимеразу. Авторы продемонстрировали возможность использования фага и рекомбинантной ПС-деполимеразы для диагностики и лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae* K1-типа [80]. Majkowska-Skrobek et al. (2016) идентифицировали и охарактеризовали ПС-деполимеразу бактериофага KP36. Они обнаружили, что ПС-деполимераза эффективна против нативной капсулы клинических штаммов *K. pneumoniae* K63-типа и снижает уровень смертности личинок *Galleria mellonella*, инфицированных *K. pneumoniae*. Исследователи идентифицируют данную ПС-деполимеразу как подходящее средство для разработки новых методов лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae* [33]. Hsieh et al. (2017) сообщают о выделении фаговых ПС-деполимераз, специфичных для капсульных типов K30/K69, K8 или K5 и о перспективе использования их для типирования и лечения инфекции *K. pneumoniae* [81]. Также сравнительно недавно Pan et al. (2017) описали бактериофаг ФК64–1, способный размножаться на широком спектре штаммов *Klebsiella* – представителей 10 капсульных типов и обладающих 11 типами ПС-деполимераз. Каждая из ПС-деполимераз имеет активность, специфичную для полисахаридов капсульных типов K1, K11, K21, K25, K30/K69, K35, K64, KN4 или KN5 [82].

Зарубежными исследователями показано, что применение сочетаний «бактериофаг, обладающий ПС-деполимеразной активностью / антибиотик» или «рекомбинантная фаговая

ПС-деполимераза / антибиотик» эффективно подавляет клебсиеллезные инфекции [78, 79, 83]. Рекомбинантные ПС-деполимеразы также можно использовать в диагностических целях. Hsu et al. (2013) и Lin et al. (2014) высказывают предположение о том, что высокая специфичность ПС-деполимераз позволит сделать капсульное типирование штаммов *K. pneumoniae* более эффективным по сравнению с фаготипированием [39, 80].

### Заключение

В качестве альтернативы антибактериальным препаратам все чаще предлагаются бактериофаги – вирусы, инфицирующие бактерии. Бактериофаги имеют ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками (например, узконаправленное действие), однако не лишены и недостатков. Несмотря на неоднозначный опыт прошлых лет, современные технологии позволяют эффективно реорганизовать классическую фаготерапию. Мы можем быстрее и эффективнее подбирать бактериофаги, можем характеризовать их с точки зрения генома – это дает возможность избежать таких нежелательных компонентов фагового генома, как гены вирулентности или резистентности, а также гены, кодирующие образование токсинов.

Использование современных технологий позволяет более подробно исследовать возможности фаготерапии. Изучение тонкой структуры бактериофагов, механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой может открыть новые возможности в поиске альтернативных противомикробных агентов. Одно из наиболее актуальных направлений – изучение ферментов, используемых фагами в процессе адсорбции на поверхности бактериальной клетки. ПС-деполимеразы необходимы бактериофагу для разрушения полисахаридного слоя, экранирующего рецепторы клеточной стенки бактерий, и последующего взаимодействия с бактериальной клеткой. Бактериофаги, обладающие ПС-деполимеразой, – идеальные кандидаты для борьбы с капсулообразующими бактериями. Эти ферменты эффективно расщепляют полисахаридный слой бактерий, существенно снижая их устойчивость к действию защитных сил иммунной системы макроорганизма.

Исследования фаговых ПС-деполимераз показывают, что они могут применяться в комбинации с противомикробными препаратами против резистентных патогенов, особенно тех, которые входят в состав биопленок. Помимо борьбы с бактериальными инфекциями, ПС-деполимеразы могут быть использованы в качестве альтернативы антисыворотке для типирования бактериальных штаммов и обнаружения полисахаридов в иммуногистологических исследованиях. Высокая специфичность ПС-деполимераз позволяет высказывать предположение о том, что капсульное типирование на основе этих ферментов может быть более эффективным, чем фаготипирование.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора и гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 г.).

### Литература/References

1. Prigent M, Leroy M, Confalonieri F, Dutertre M, DuBow MS. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. *Extremophiles*. 2005 Aug;9(4):289-96. DOI: 10.1007/s00792-005-0444-5
2. Srinivasiah S, Bhavsar J, Thapar K, Liles M, Schoenfeld T, Wommack KE. Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. *Res Microbiol*. 2008 Jun;159(5):349-57. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.04.010
3. Friedman SD, Genthner FJ, Gentry J, Sobsey MD, Vinjé J. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family *Leviviridae*). *J Virol*. 2009 Nov;83(21):11233-43. DOI: 10.1128/JVI.01308-09
4. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol*. 2011 Oct;1(4):298-303. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.06.009
5. Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):171-82. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00233-2
6. Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2192-7. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2192
7. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:475-93. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134123
8. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010 May;8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315
9. McMahon SA, Roberts GA, Johnson KA, Cooper LP, Liu H, White JH, et al. Extensive DNA mimicry by the *ArdA* anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance. *Nucleic Acids Res*. 2009 Aug;37(15):4887-97. DOI: 10.1093/nar/gkp478
10. Zhu H, Yin S, Shuman S. Characterization of polynucleotide kinase/phosphatase enzymes from *Mycobacterio* phages *omega* and *Cjw1* and vibriophage KVP40. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26358-69. DOI: 10.1074/jbc.M403200200
11. Rodrigue S, Malmstrom RR, Berlin AM, Birren BW, Henn MR, Chisholm SW. Whole genome amplification and *de novo* assembly of single bacterial cells. *PLoS One*. 2009 Sep 2;4(9):e6864. DOI: 10.1371/journal.pone.0006864
12. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1951 Sep;62(3):293-300.
13. Weinbauer MG, Rassoulzadegan F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ Microbiol*. 2004 Jan;6(1):1-11. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x
14. Parmar KM, Hathi ZJ, Dafale NA. Control of Multidrug-Resistant Gene Flow in the Environment Through Bacteriophage Intervention. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017 Mar;181(3):1007-1029. DOI: 10.1007/s12010-016-2265-7
15. Ackermann HW. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res*. 1998;51:135-201. DOI: 10.1016/s0065-3527(08)60785-x
16. Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Mar;64(1):69-114. DOI: 10.1128/mmbr.64.1.69-114.2000
17. Ackermann HW, Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol*. 2012 Oct;157(10):1843-9. DOI: 10.1007/s00705-012-1383-y
18. Catalano C. Viral genome packaging machines: genetics, structure, and mechanism: Springer, 2005 edition.
19. Adriaenssens EM, Wittmann J, Kuhn JH, Turner D, Sullivan MB, Dutilh BE, et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch Virol*. 2018 Apr;163(4):1125-1129. DOI: 10.1007/s00705-018-3723-z
20. Fokine A, Rossmann MG. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*. 2014 Jan 1;4(1):e28281. DOI: 10.4161/bact.28281

21. Iranzo J, Krupovic M, Koonin EV. The Double-Stranded DNA Virosphere as a Modular Hierarchical Network of Gene Sharing. *mBio*. 2016 Aug 2;7(4). pii: e00978-16. DOI: 10.1128/mBio.00978-16
22. Barylski J, Nowicki G, Goździcka-Józefiak A. The discovery of phiAGATE, a novel phage infecting *Bacillus pumilus*, leads to new insights into the phylogeny of the subfamily *Spounavirinae*. *PLoS One*. 2014 Jan 23;9(1):e86632. DOI: 10.1371/journal.pone.0086632
23. Lindberg AA. Bacteriophage receptors. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:205-41. DOI: 10.1146/annurev.mi.27.100173.001225
24. Летаров АВ, Куликов ЕЕ. Адсорбция бактериофагов на клетках бактерий. *Успехи биологической химии*. 2017;57:153-208. / Letarov AV, Kulikov EE. Adsorbtsiya bakteriofagov na kletkakh bakterii. *Uspekhi biologicheskoi khimii*. 2017;57:153-208. (In Russian).
25. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):593-656. DOI: 10.1128/mmr.67.4.593-656.2003
26. Schmid J, Sieber V, Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*. 2015 May 26;6:496. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00496
27. Leiman PG, Molineux IJ. Evolution of a new enzyme activity from the same motif fold. *Mol Microbiol*. 2008 Jul;69(2):287-90. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06241.x
28. Sertic V. Untersuchungen iiber einen Lysinonen bildenden Bakteriophagen. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene*. 1929;110:125-139.
29. Humphries, S. Enzymatic activity of bacteriophage-culture lysates I. A capsule lysine active against *Klebsiella pneumoniae* type A. *Journal of Bacteriology*. 1948;56:683.
30. Casjens SR, Molineux IJ. Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses. *Adv Exp Med Biol*. 2012;726:143-79. DOI: 10.1007/978-1-4614-0980-9\_7
31. Weigle PR, Scanlon E, King J. Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins. *J Bacteriol*. 2003 Jul;185(14):4022-30. DOI: 10.1128/jb.185.14.4022-4030.2003
32. Machida Y, Miyake K, Hattori K, Yamamoto S, Kawase M, Iijima S. Structure and function of a novel coliphage-associated sialidase. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Jan 15;182(2):333-7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08917.x
33. Majkowska-Skrobek G, Łątka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, Romano M. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. *Viruses*. 2016 Dec 1;8(12). pii: E324. DOI: 10.3390/v8120324
34. Yan J, Mao J, Xie J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications *BioDrugs*. 2014 Jun;28(3):265-74. DOI: 10.1007/s40259-013-0081-y
35. Stummeyer K, Schwarzer D, Claus H, Vogel U, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M. Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(5):1123-35.
36. Yan JJ, Zheng PX, Wang MC, Tsai SH, Wang LR, Wu JJ. Allocation of *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates into four distinct groups by ompK36 typing in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol*. 2015 Oct;53(10):3256-63. DOI: 10.1128/JCM.01152-15
37. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Mar;100(5):2141-51. DOI: 10.1007/s00253-015-7247-0
38. Gutiérrez D, Briers Y, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, García P. Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB\_SepiS-phiPLA7 as an anti-biofilm agent in Staphylococcal species. *Front Microbiol*. 2015 Nov 25;6:1315. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01315
39. Hsu CR, Lin TL, Pan YJ, Hsieh PF, Wang JT. Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of *Klebsiella pneumoniae* and characterization of its polysaccharide depolymerase. *PLoS One*. 2013 Aug 2;8(8):e70092. DOI: 10.1371/journal.pone.0070092
40. Barbir S, Müller JJ, Uetrecht C, Clark AJ, Heinemann U, Seckler R. Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Mol Microbiol*. 2008 Jul;69(2):303-16. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06311.x
41. Lindsay AM, Zhang M, Mitchell Z, Holden MTG, Waller AS, Sutcliffe IC, Black GW. The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection. *Microbiology*. 2009 Feb;155(Pt 2):443-449. DOI: 10.1099/mic.0.020826-0
42. Glonti T, Chanishvili N, Taylor PW. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginate acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 2010 Feb;108(2):695-702. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04469.x
43. hompson JE, Pourhossein M, Waterhouse A, Hudson T, Goldrick M, Derrick JP, Roberts IS. The K5 lyase KfIA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *J Biol Chem*. 2010 Jul 30;285(31):23963-9. DOI: 10.1074/jbc.M110.127571
44. d'Herelle F. 1921. Le bactériophage: son rôle dans l'immunité. Masson et Cie, Paris, France.
45. Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. *Journal De La Societe De Biologie*. 1921;85:1120-1.
46. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar;45(3):649-59. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
47. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):226-35. DOI: 10.4161/viru.2599
48. Жуков-Вережников НН, Перемитина ЛД, Берило ЭА, и др. Изучение терапевтического эффекта препаратов бактериофага в комплексном лечении гнойных хирургических заболеваний. *Советская медицина*. 1978;12:64-66. / Zhukov-Verezhnikov NN, Peremitina LD, Berilo EA, et al. Izuchenie terapevticheskogo efekta preparatov bakteriofaga v kompleksnom lechenii gnoinykh khirurgicheskikh zabolevanii. *Sovetskaya meditsina*. 1978;12:64-66. (In Russian).
49. Кокин ГА. Применение бактериофагов в хирургии. *Советская медицина*. 1941;9:15-18. / Kokin GA. Primenenie bakteriofagov v khirurgii. *Sovetskaya meditsina*. 1941;9:15-18. (In Russian).
50. Кочеткова ВЛ, Мамонтов ЛС, Московцева РЛ, и др. Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных. *Советская медицина*. 1989;6:23-26. / Kochetkova VL, Mamontov LS, Moskovtseva PL, et al. Fagoterapiya posleoperatsionnykh gnoinovospalitel'nykh oslozhnenii u onkologicheskikh bol'nykh. *Sovetskaya meditsina*. (In Russian).
51. Kaczowski H, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Zdrojewicz Z, Cwioro F. Use of bacteriophages in the treatment of chronic bacterial diseases. *Wiad Lek*. 1990 Feb 1-15;43(3-4):136-41.
52. Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance – problems, progress and prospects. *N Engl J Med*. 2014 Nov 6;371(19):1761-3. DOI: 10.1056/NEJMp1408040
53. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*. 2014 Aug;14(8):742-750. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7
54. Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*. 2013 Feb;121(2):a48-53. DOI: 10.1289/ehp.121-a48
55. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):397-404. DOI: 10.1128/AAC.00669-09
56. Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol*. 2008 Oct 27;8:79. DOI: 10.1186/1472-6750-8-79

57. Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato S, Morita T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration. *PLoS One*. 2012;7(10):e47742. DOI: 10.1371/journal.pone.0047742
58. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009 Aug;34(4):349-57. DOI: 10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x
59. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011 Mar;1(2):111-114. DOI: 10.4161/bact.1.2.14590
60. Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, et al. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res*. 2012;83:41-71. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5
61. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011 Oct;14(5):524-31. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.028
62. Cooper CJ, Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage-Based Therapeutics. *Front Microbiol*. 2016 Aug 3;7:1209. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01209
63. Rose T, Verbeken G, Vos DD, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Lavigne R. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int J Burns Trauma*. 2014 Oct 26;4(2):66-73.
64. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2874-8. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005
65. Lu TK, Collins JJ. Engineered Bacteriophage Targeting Gene Networks as Adjuvants for Antibiotic Therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24;106(12):4629-34. DOI: 10.1073/pnas.0800442106
66. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a Phase I safety trial. *J Wound Care*. 2009 Jun;18(6):237-8,240-3. DOI: 10.12968/jowc.2009.18.6.42801
67. Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1987;35(5):569-83.
68. Ciso M, Dabrowski M, Weber-Dabrowska B, Woytoń A. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1987;35(2):175-83.
69. Strój L, Weber-Dabrowska B, Partyka K, Mulczyk M, Wójcik M. Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn. *Neurol Neurochir Pol*. 1999 May-Jun;33(3):693-8.
70. Fernandes E, Martins VC, Nóbrega C, Carvalho CM, Cardoso FA, Cardoso S, et al. A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells. *Biosens Bioelectron*. 2014 Feb 15;52:239-46. DOI: 10.1016/j.bios.2013.08.053
71. Adriaenssens EM, Van Vaerenbergh J, Vandenheuvel D, Dunon V, Ceysens PJ, De Proft M, et al. T4-related bacteriophage LIMESTONE isolates for the control of soft rot on potato caused by *Dickeya solani*. *PLoS One*. 2012;7(3):e33227. DOI: 10.1371/journal.pone.0033227
72. Spricigo DA, Bardina C, Cortés P, Llagostera M. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol*. 2013 Jul 15;165(2):169-74. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.009
73. Migueis S, Saraiva C, Esteves A. Efficacy of LISTEX P100 at Different Concentrations for Reduction of *Listeria monocytogenes* Inoculated in Sashimi. *J Food Prot*. 2017 Dec;80(12):2094-2098. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-098
74. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*. 2008;11(5):393-400.
75. Pan YJ, Lin TL, Lin YT, Su PA, Chen CT, Hsieh PF, et al. Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by wzc sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Feb;59(2):1038-47. DOI: 10.1128/AAC.03560-14
76. Mushtaq N, Redpath MB, Luzio JP, Taylor PW. Prevention and cure of systemic *E. coli* K1 infection by modification of the bacterial phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 May;48(5):1503-8. DOI: 10.1128/aac.48.5.1503-1508.2004
77. Kassa T, Chhibber S. Thermal treatment of the bacteriophage lysate of *Klebsiella pneumoniae* B5055 as a step for the purification of capsular depolymerase enzyme. *J Virol Methods*. 2012 Jan;179(1):135-41. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.10.011
78. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Dec;64(6):1212-8. DOI: 10.1093/jac/dkp360
79. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*. 2010 Aug;26(6):729-37. DOI: 10.1080/08927014.2010.511196
80. Lin TL, Hsieh PF, Huang YT, Lee WC, Tsai YT, Su PA. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment. *J Infect Dis*. 2014 Dec 1;210(11):1734-44. DOI: 10.1093/infdis/jiu332
81. Hsieh PF, Lin HH, Lin TL, Chen YY, Wang JT. Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization. *Sci Rep*. 2017 Jul 4;7(1):4624. DOI: 10.1038/s41598-017-04644-2
82. Pan YJ, Lin TL, Chen CC, Tsai YT, Cheng YH, Chen YY, et al. *Klebsiella* phage  $\phi$ K64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types. *J Virol*. 2017 Feb 28;91(6). pii: e02457-16. DOI: 10.1128/JVI.02457-16
83. Chai H, Allen WE, Hicks RP. Synthetic Antimicrobial Peptides Exhibit Two Different Binding Mechanisms to the Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Med Chem*. 2014;2014:809283. DOI: 10.1155/2014/809283

---

**Информация об авторах:**

Комисарова Екатерина Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: ekaterina20009@mail.ru

Красильникова Валентина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, п. Оболенск, Московская область, ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: krasv55@mail.ru

---

**Information about authors:**

Ekaterina V. Komisarova, junior researcher of laboratory of molecular diagnostics and genetic engineering preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: ekaterina20009@mail.ru

Valentina M. Krasilnikova, PhD (Biology), senior researcher of laboratory of molecular diagnostics and genetic engineering preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: krasv55@mail.ru

# Передаточные устройства как фактор снижения рисков при передаче патогенных биологических агентов в бактериологических лабораториях

Л.В.Чекан, Е.А.Тюрин

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

В статье рассматривается вопрос об использовании передаточных устройств для передачи патогенных биологических агентов и материалов, содержащих или подозрительных на содержание микроорганизмов, в помещениях микробиологических лабораторий различных уровней защиты и за их пределы. Проанализированы различные типы передаточных устройств, используемых в лабораториях. Сделаны выводы о преимуществах отдельных видов передаточных устройств для соблюдения требований биологической безопасности в бактериологических лабораториях.

*Ключевые слова:* бактериологическая лаборатория, биологическая безопасность, патогенные биологические агенты, передаточные устройства, уровни защиты

**Для цитирования:** Чекан Л.В., Тюрин Е.А. Передаточные устройства как фактор снижения рисков при передаче патогенных биологических агентов в бактериологических лабораториях. Бактериология. 2019; 4(4): 15–18. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-15-18

## Transferring devices as a risk reduction factor in the transfer of pathogenic biological agents in bacteriological laboratories

L.V.Chekan, E.A.Tyurin

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

The article addresses the issue of the use of transferring devices for the transfer of pathogenic biological agents and materials containing or suspicious of the content of microorganisms in the microbiological laboratories of various levels of protection and beyond. Various types of transferring devices used in laboratories are analyzed. Conclusions are drawn about the advantages of certain types of transmission devices to comply with biological safety requirements in bacteriological laboratories.

*Key words:* bacteriological laboratory, biological safety, pathogenic biological agents, transmission devices, protection levels

**For citation:** Chekan L.V., Tyurin E.A. Transferring devices as a risk reduction factor in the transfer of pathogenic biological agents in bacteriological laboratories. Bacteriology. 2019; 4(4): 15–18. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-15-18

**И**нфекционные заболевания продолжают представлять угрозу для здоровья человека. Поэтому, несмотря на быстрый прогресс в развитии медико-биологических научных подходов, совершенствование инженерно-технического обеспечения работ с микроорганизмами, проблема борьбы с внутрилабораторными заражениями персонала лаборато-

рии продолжает оставаться актуальной [1, 2]. Появление «новых», «эмерджентных» и возвращение «старых» инфекционных заболеваний заставляет интенсивно продолжать их изучение для поиска и разработки средств лечения и профилактики, в целях развития медицинской микробиологии, бактериологии и биотехнологии [3, 4].

### Для корреспонденции:

Чекан Лариса Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0016

E-mail: chekan@obolensk.org

Статья поступила 27.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Larisa V. Chekan, senior researcher head of the of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0016

E-mail: chekan@obolensk.org

The article was received 27.11.2019, accepted for publication 20.12.2019



Соблюдение требований биологической безопасности при проведении работ с микроорганизмами определяет мероприятия по снижению риска в области охраны здоровья персонала микробиологических лабораторий и обеспечению защиты окружающей среды. Этот вопрос продолжает оставаться актуальным в связи с тем, что количество лабораторий различных уровней защиты, где проводят работы с патогенными биологическими агентами (ПБА), увеличивается, объемы и сложность работ в них возрастают.

Устройство и оборудование бактериологических лабораторий должны обеспечивать максимально возможную защиту персонала от ПБА, снижение риска попадания ПБА в окружающую среду. Необходимые уровни биологической безопасности лабораторий от первого до четвертого обеспечиваются инженерными защитными системами биологической безопасности [5–8]. Помещения бактериологических лабораторий с одинаковыми уровнями биологической опасности выделяют в отдельные самостоятельные блоки, создавая контур герметизации, разделяя их между собой и отделяя их от внешней среды барьерными инженерными системами биологической безопасности, создавая так называемые передаточные модули [9, 10].

Передаточные модули – это элементы изолирующего контура ограждающих строительных конструкций лаборатории, предназначенные для прерывания перемещения контаминированных материальных и воздушных потоков из помещений разных уровней защиты и обеззараживания их различными химическими и физическими методами. При этом технология и режимы обеззараживания зависят от физического состояния материального потока, что позволяет наиболее эффективно проводить обеззараживание материалов, содержащих ПБА, и контаминированных предметов, а также входящего и удаляемого воздуха.

Для обеспечения направленности и ограничения движения материальных и воздушных потоков (твердые отходы, биологический материал и другие предметы, потенциально зараженные ПБА) из помещений лабораторий различных уровней риска и защиты устанавливают границы зон. На границах зон размещают специальные устройства, обеспечивающие контур герметизации, проводят процессы дифференцированной обработки воздушных вентиляционных и технологических выбросов, обеззараживание твердых и жидких отходов [9, 11].

Требования биологической безопасности в бактериологических лабораториях различного уровня защиты обеспечивают инженерные системы биологической безопасности (санитарные пропускники, шлюзы, камеры и т.п.) [7, 8, 10]. Эти системы разделены и работают самостоятельно, смешивание процессов не допускается. Устройства предназначены для контролируемого перемещения персонала лаборатории, разделения материальных потоков и перемещения различных предметов, материалов, воздуха внутри и за пределы лаборатории.

**Целью работы** являлся анализ биобезопасности и оценка типов существующих барьерных передаточных устройств, используемых для перемещения материалов с ПБА в самой лаборатории и за ее пределы.

К передаточным устройствам относятся воздушные шлюзы, проходные автоклавы, передаточные ванны или

парогазовые камеры. Выбор шлюзового устройства определяется требованиями биологической безопасности, предъявляемыми к передаче материальных потоков, перемещаемых между помещениями, конкретно для каждой из лабораторий.

Самым распространенным способом передачи материалов между зонами в бактериологической лаборатории («за-разная» – «чистая», «заразная» – «заразная», «чистая» – «заразная») является шлюзование. Принцип шлюзования заключается в перемещении материалов и имущества через воздушную среду устройства шлюза с поочередным открыванием и закрыванием дверей с проведением дезинфекции наружных поверхности передаваемого имущества и воздуха рабочей камеры шлюза. При этом одна из дверей шлюза остается постоянно закрытой. Этим достигается герметизация контура лаборатории, защита от возможного попадания воздуха из «заразного» или «чистого» помещения. Способ шлюзования служит основой снижения риска и обеспечения требований биологической безопасности для перемещения материалов между помещениями различной зональности, как в лаборатории, так и за ее пределы.

Шлюз воздушный передаточный представляет собой наиболее простую инженерную конструкцию, позволяющую передавать имущество из одного помещения в другое независимо от зональности. Конструкцию изготавливают из нержавеющей стали или из иного негорючего материала, устойчивого к воздействию дезинфицирующих (мочных) растворов и ультрафиолетовому облучению. Дверцы снабжают резиновыми прокладками для обеспечения герметичности камеры шлюза с дополнительным усилием на запорную арматуру (ручки) при передаче и во время проведения цикла обеззараживания. Шлюз оборудован устройством для распыления дезинфицирующего раствора отдельно или в совокупности с ультрафиолетовым облучением. Пульт управления монтируют на «чистой» стороне помещения лаборатории для открывания дверей, включения ультрафиолетовых ламп или подачи дезраствора. Имеется таймер для контроля времени обеззараживания, контроллер подачи дезраствора в камеру шлюза, ручки управления запорами дверей. Возможно установление манометра на внешней стороне корпуса шлюза для контроля давления внутри конструкции. Рядом размещают переговорное устройство для переговоров аппаратчиков о проведении процесса между зонами.

В некоторых случаях при передаче материалов внутри «заразной» зоны лаборатории одного уровня защиты, например, из блока для содержания инфицированных животных в помещение для их вскрытия, расположенных в одних условиях поддержания уровня разрежения, направленности воздушных потоков и кратности воздухообмена, возможна установка передаточного окна. Окно изготавливают из того же материала, что и шлюз, но с одной дверцей, которая должна открываться в сторону помещения с меньшим уровнем риска. Передаваемое имущество, уложенное в контейнер или бикс, при подготовке к передаче обеззараживают протиранием дезраствором и затем передают из одного помещения в другое. В этом случае у окна необходимо установить небольшие столики или тумбочки с одной и другой стороны.

При получении материала, поступающего с «чистой» стороны лаборатории, для проведения диагностических исследований на наличие ПБА I-II групп устанавливают только передаточные шлюзы. Передаточные шлюзы также необходимо устанавливать для передачи имущества из лаборатории с более низким уровнем защиты в лабораторию с более высоким уровнем, а также когда из лаборатории с более высоким уровнем защиты материал передают в лабораторию с более низким уровнем защиты или в «чистую» зону лаборатории.

Передачу исследуемых материалов при ПЦР из рабочей зоны 1 и проб при смежном расположении помещений рабочих зон 1, 2, 3 желателно осуществлять через шлюзовые передаточные окна, а в рабочие зоны 4-1 и 4-2 достаточно передаточного окна [12].

Для передачи на уничтожение материалов, содержащих ПБА I-IV групп, используют паровой стерилизатор (автоклав) проходного типа, который устанавливают на границе зон. Эти устройства служат для термического обеззараживания острым паром помещенных внутрь контейнеров передаваемых материалов, содержащих ПБА, и наружных поверхностей контейнеров. Автоклавы проходного типа работают по принципу шлюзования и оснащены автоматикой, предотвращающей возможность открывания обеих дверей одновременно. Контроль режима работы автоклавов осуществляют по световой сигнализации и приборам контроля. Давление и температуру, т.е. эффективность обеззараживания, в аппаратах контролируют бактериологическим методом и химическими тестами. Бактериологический метод основан на обеззараживании спор тест-культуры *B. stearothermophilus* ВКМ В-718 [7, 8]. Данный способ обеспечивает обеззараживание и наружных поверхностей и внутреннего содержимого контейнеров

Кроме автоклавов, лаборатории могут быть оборудованы паровоздушными камерами, газовыми (пароформалиновыми) передаточными камерами и так называемыми «камерами проныривания» [11], которые используют для наружного обеззараживания поверхностей передаваемых объектов. В «камерах проныривания», или передаточных ваннах проходного типа, которые служат для передачи имущества между помещениями одной зональности или разных зональностей, проводят обеззараживание поверхностей контейнеров в жидких дезинфицирующих средствах. Они представляют собой достаточно глубокую емкость, которую заполняют дезинфицирующим раствором, к которому чувствительны микроорганизмы [11]. В дезинфицирующий раствор, залитый в ванну, опускают на глубину не менее 10 см вертикальную перегородку, которая разделяет воздушное пространство смежных помещений одной зоны или различных зон. Объекты опускают в ванну с жидкостью с одной стороны и извлекают с другой. При прохождении под перегородкой емкости объекты полностью погружаются в дезинфицирующий раствор и выдерживаются в «камере проныривания» требуемое время при оптимальной температуре. При этом необходимо постоянно контролировать концентрацию применяемого дезинфектанта, его эффективность и его своевременную замену при работе с другими видами ПБА. Режимы обеззараживания и концентрация препарата выбираются в соответствии с требованиями нор-

мативных документов. Передаточные ванны проходного типа используют для передачи предметов через среду жидких дезинфицирующих средств, обладающих широким спектром антимикробного действия и вызывающих гибель всех видов и форм микроорганизмов на поверхности объектов. В настоящее время они не находят широкого применения. Данный вид передаточного устройства имеет ряд существенных недостатков, так как отсутствует возможность контроля эффективности процесса деконтаминации, необходимо специальное оборудованное помещение с мощной приточно-вытяжной системой вентиляции, выполненной из антикоррозийных материалов. Слив большого количества дезинфектанта также требует контроля экологически щадящих режимов.

Еще одной из конструкций биологической безопасности, устанавливаемых на границе зон, являются «камеры газовые передаточные» проходного типа, или пароформалиновые камеры. Камера представляет собой шлюз из металла большого объема (около 2,0 м<sup>3</sup>). Ее устанавливают на границе «заразной» и «чистой» зон. Управление процессом осуществляют с «чистой» стороны лаборатории. Для подачи пара и других парообразных продуктов для обеззараживания камеру «обвязывают» системой трубопроводов. Образовавшийся после процесса в камере конденсат пара самоотекотом попадает в систему обеззараживания стоков лаборатории, где их деконтаминируют термическим способом.

Камеры в основном предназначены для проведения процесса обеззараживания рабочей и защитной одежды персонала лаборатории. Одежду размещают в камере, развешивая на специальных плечиках, загружая ее со стороны «заразной» зоны, затем обеззараживают паром при температуре плюс 100 ± 2°С в течение 2 ч. Возможно обеззараживание химическим способом (формалином) с последующей дезактивацией аммиаком и стиркой в прачечной [7, 8]. Контроль работы камер осуществляют по приборам давления и температуры, а эффективность обеззараживания контролируют бактериологическими тест-объектами, размещая их во внутреннем объеме.

Работу всех передаточных устройств постоянно контролируют для оценки эффективности обеззараживания передаваемого имущества, повышения уровня биологической безопасности и снижения уровня риска для персонала лаборатории.

## Литература

1. Онищенко ГГ, Пальцев МА, Зверев ВВ, Иванов АА, Киселев ВИ, Нетесов СВ, и др. Биологическая безопасность. М.: Медицина; 2006, 304 с.
2. Боровик РВ, Дмитриев ГА, Коломбет ЛВ, Победимская ДД, Ремнев ЮВ, Тюрин ЕА, Федоров НА. Основы биологической безопасности: принципы и практика. Учебно-методическое пособие. М.: Медицина для вас; 2008, 303 с.
3. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Кривуля СД, Федоров ЮМ, Топорков ВП. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;92(2):5-9.
4. Львов ДК. Новые и возвращающиеся инфекции – дремлющий вулкан. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;96(2):5-8.
5. Дмитриева ВА, Боронин АМ, Дмитриев ВВ, Доброхотский ОН, Жариков ГА, Коломбет ЛВ, и др. Учебное пособие по биобезопасности. Пушино/Тула: Изд-во ТулГУ; 201, 500 с.

6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ed. L.C.Chosewood, D.E.Wilson. Centers for Disease Control and Prevention (USA), 5 ed. Washington, 2007. [сайт] URL Сайт: [www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMBl\\_5th\\_Edition.pdf](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMBl_5th_Edition.pdf)
7. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. 2013, 195 с.
8. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08. 2008, 97 с.
9. «Ведомственные строительные нормы. Инструкция по строительному проектированию предприятий медицинской и микробиологической промышленности». ВСН 64-064-88. М., 1988, 26 с.
10. Найденов АЯ. Безопасность работ в микробиологических лабораториях. Защитная эффективность инженерных систем безопасности. М.: ДеЛи плюс; 2013, 224 с.
11. Дроздов СГ, Гарин НС, Джиндоян ЛС, Тарасенко ВМ. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина; 1987, 256 с.
12. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». МУ 1.3.2569-09.
5. Dmitrieva VA, Boronin AM, Dmitriev VV, Dobrokhotskii ON, Zharikov GA, Kolombet LV, et al. Uchebnoe posobie po biobezopasnosti. Pushchino/Tula: "TulGU" Publ.; 201, 500 p. (In Russian).
6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ed. L.C.Chosewood, D.E.Wilson. Centers for Disease Control and Prevention (USA), 5 ed. Washington, 2007. [сайт] URL Сайт: [www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMBl\\_5th\\_Edition.pdf](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMBl_5th_Edition.pdf)
7. Sanitary and epidemiological rules "Safety of working with pathogenicity groups I–II microorganisms". SP 1.3.3118-13. 2013, 195 p. (In Russian).
8. Sanitary and epidemiological rules "Safety of working with microorganisms of groups III–IV of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08. 2008, 97 p. (In Russian).
9. "Departmental building codes. Instructions for construction design of medical and microbiological industry enterprises". VSN 64-064-88. Moscow, 1988, 26 p. (In Russian).
10. Naidenov AYa. Bezopasnost' rabot v mikrobiologicheskikh laboratoriyakh. Zashchitnaya effektivnost' inzhenernykh sistem bezopasnosti [Safety of work in microbiological laboratories. Protective efficiency of engineering security systems]. Moscow: "DeLi plyus" Publ.; 2013, 224 p. (In Russian).
11. Drozdov SG, Garin NS, Dzhindoyan LS, Tarasenko VM. Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh [Bases of safety in microbiological and virological laboratories]. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1987, 256 p. (In Russian).
12. Guidelines "Organization of work of laboratories using methods of amplification of nucleic acids when working with material containing microorganisms of I–IV groups of pathogenicity". MU 1.3.2569-09. (In Russian).

## References

1. Onishchenko GG, Pal'tsev MA, Zverev VV, Ivanov AA, Kiselev VI, Netesov SV, i dr. Biologicheskaya bezopasnost [Biological safety]. Moscow: "Meditsina" Publ.; 2006, 304 p. (In Russian).
2. Borovik RV, Dmitriev GA, Kolombet LV, Pobedimskaya DD, Remnev YuV, Tyurin EA, Fedorov NA. Osnovy biologicheskoi bezopasnosti: printsipy i praktika [Basis of biological safety: principles and practice.]. Moscow: "Meditsina dlya vas" Publ.; 2008, 303 p. (In Russian).
3. Onishchenko GG, Kutyrev VV, Krivulya SD, Feodorov YuM, Toporkov VP. Philosophy of Infectious Diseases Control and Sanitary Protection of Territories under the Present-Day Situation. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2006;92(2):5-9. (In Russian).
4. L'vov DK. Emerging and Re-Emerging Infections – a Dozing Volcano. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2008;96(2):5-8. (In Russian).

## Информация об авторе:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0016  
 E-mail: [turin@obolensk.org](mailto:turin@obolensk.org)

## Information about author:

Eugeny A. Tyurin, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0016  
 E-mail: [turin@obolensk.org](mailto:turin@obolensk.org)

## НОВОСТИ НАУКИ

### Измененные в лаборатории комары против распространения лихорадки Денге



Австралийские ученые выпустили комаров, несущих бактерии, которые предотвращают передачу вируса денге. Стратегия привела к снижению передачи Денге на 76% в Индонезии, где часто бывают вспышки Денге. Подобные сокращения были замечены в городской местности около Рио-де-Жанейро и вокруг Нячанга, Вьетнам. Выпуск комаров-переносчиков вольбахии в Крайнем Северном Квинсленде, Австралия, начавшийся восемь лет назад, привел к снижению заболеваемости Денге на 96%. Исследование считается предварительным, пока не будет опубликовано в рецензируемом журнале.

Инфицированные вольбахией комары создаются в лаборатории путем введения бактерий в их яйца. Исследователи утверждают, что бактерии также подавляют чикунгунью и зика.

Полевые испытания в Вольбахии продолжаются и, учитывая многообещающие результаты, распространяются на Колумбию, Шри-Ланку, Индию и островные государства Западной части Тихого океана.

[https://www.webmd.com/a-to-z-guides/news/20191122/bacteria-could-be-weapon-against-mosquito-borne-dengue?src=RSS\\_PUBLIC](https://www.webmd.com/a-to-z-guides/news/20191122/bacteria-could-be-weapon-against-mosquito-borne-dengue?src=RSS_PUBLIC)

# Ренатурация рекомбинантных белков

Т.В.Фёдоров, Т.В.Решетняк, Е.А.Панферцев, С.Ф.Бикетов

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

Основной проблемой получения рекомбинантных белков является восстановление их нативного состояния на конечном этапе биотехнологической цепи выделения целевого продукта. В работе рассматриваются общие принципы формирования активной структуры молекулы белка, обобщены методы ренатурации белков и факторы, влияющие на эффективность рефолдинга.

*Ключевые слова:* ренатурация, рефолдинг, рекомбинантные белки

**Для цитирования:** Фёдоров Т.В., Решетняк Т.В., Панферцев Е.А., Бикетов С.Ф. Ренатурация рекомбинантных белков. Бактериология. 2019; 4(4): 19–28. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-19-28

## Renaturation of recombinant proteins

T.V.Fedorov, T.V.Reshetnyak, E.A.Panfertsev, S.F.Biketov

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

The main problem of obtaining recombinant proteins is the recovery of their native state at the final stage of the biotechnological chain of isolation of the target product. The paper discusses the general principles of the formation of the active structure of a protein molecule, summarizes methods for protein renaturation and factors affecting the effectiveness of refolding.

*Keywords:* renaturation, refolding, recombinant proteins

**For citation:** Fedorov T.V., Reshetnyak T.V., Panfertsev E.A., Biketov S.F. Renaturation of recombinant proteins. Bacteriology. 2019; 4(4): 19–28. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-19-28

**М**етод экспрессии клонированных генов в бактериальных, дрожжевых и клеточных культурах насекомых и млекопитающих позволяет заменить труднодоступные натуральные биологически активные белки и широко используется для получения рекомбинантных белков как для производства фармацевтических препаратов, так и в научных целях. Массивная продукция клетками рекомбинантных белков создает предпосылки для относительно быстрого, недорогого и легко масштабируемого производства, однако нередко на этапе очистки происходит значительная потеря целевого продукта. В качестве иллюстрации можно рассмотреть одну из самых распространенных технологий получения рекомбинантных белков – культивирование рекомбинантного микроорганизма *Escherichia coli* с внутриклеточным накоплением белкового продукта в виде телец включения (inclusion bodies). С одной стороны, процесс желательный, поскольку накопление белка в тельцах включения предохра-

няет его от протеолитической деградации, а клетку – от воздействия чужеродного белка на метаболизм. С другой стороны, это порождает необходимость высвобождения телец из клеток, отмытки от балласта, растворения через денатурацию с помощью мочевины (или другого хаотропного агента) и последующей ренатурации белка. Эффективность первых трех стадий процесса довольно высока и не приводит к значимым потерям как количества белка, так и его биологической активности. Основную же трудность вызывает стадия восстановления нативной структуры и активности, поэтому от успешного решения данной проблемы зависит и конечный выход, и качество целевого белка.

### Синтез и фолдинг белка *in vivo*

Целью микробиологического синтеза часто является получение биологически активных белков эукариотического происхождения. У эукариот синтез белка – это многоэтап-

#### Для корреспонденции:

Фёдоров Тарас Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: tfedorov@yandex.ru

Статья поступила 10.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

#### For correspondence:

Taras V. Fedorov, PhD (Biology), researcher, department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: tfedorov@yandex.ru

The article was received 10.11.2019, accepted for publication 20.12.2019

ный регулируемый процесс, связанный с вовлечением множества сложнейших механизмов и путей их реализации.

На первых этапах биосинтеза белка в клетке при выходе полипептидной цепи из рибосом начинается так называемое котрансляционное сворачивание («фолдинг») белка, что видимо позволяет снизить барьер активации процесса через обход кинетических ловушек и повысить скорость ренатурации белков [1].

После синтеза на рибосомах белок претерпевает посттрансляционную модификацию и фолдинг, в результате приобретая необходимую для активности пространственную структуру. Помимо ряда специфических ферментов, для фолдинга синтезированного белка необходимы малые и большие шапероны. «Малые» шапероны – «белки теплового шока» – предотвращают агрегацию и протеолиз небольших белков, а «большие» шапероны, образуя «ячейку Анфинсена», способствуют фолдингу крупных многодоменных белков. Посттрансляционная модификация (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование аминокислотных групп) и фолдинг у эукариот проходят в эндоплазматическом ретикулуме, где условия максимально благоприятствуют этим процессам. Дефектные белки подвергаются протеолизу там же либо в цитозоле под действием протеосом.

#### Фолдинг белка *in vitro*

Несмотря на сложные внутриклеточные процессы и высокие энергетические затраты клетки в ходе образования зрелого белка, процесс сворачивания белковой молекулы в зрелую структуру может с успехом проходить *in vitro* спонтанно, без участия каких-либо компонентов клеточной среды, поскольку основные затраты клетки по наработке нативного белка в условиях молекулярного краудинга [2] сводятся к регулированию его концентрации, устранению дефектных форм, а также к созданию соответствующего микроокружения, препятствующего взаимодействию белка с другими клеточными структурами.

При благоприятных условиях в ходе снижения концентрации денатурирующего агента в растворе денатурированного белка возможна самоорганизация белковой молекулы в нативную функциональную структуру. Происходит это через стадии образования стабильных и метастабильных интермедиатов, таких как «статистический клубок», «расплавленная и предрасплавленная глобула». Молекула нативного белка в растворе представляет собой относительно жесткую структуру, непроницаемую для молекул воды, окруженную гидратной оболочкой, и имеет как минимум 4 основные метастабильные состояния, или конформации.

1. Нативное состояние. Максимально упорядоченная сформированная конформация, обладающая всеми присущими данному белку свойствами, такими как биологическая активность, физико-химические характеристики.

2. Расплавленная глобула. В этой конформации белок имеет третичную, но более разупорядоченную структуру.

3. Предрасплавленная глобула – менее компактная структура, чем расплавленная глобула.

4. Форма статистического (гауссова) клубка [3, 4].

При переходе белка от нативного состояния к полностью денатурированному глобула увеличивает свой диаметр примерно на порядок [5]. Постепенная утрата третичной

структуры, экспонирование на поверхности молекулы гидрофобных участков увеличивает возможность ассоциации и агрегации белка. Первичная ассоциация белковых молекул происходит без утраты свойств, характерных для нативной структуры, и имеет обратимый характер. Однако из формы предрасплавленных олигомеров белковые ассоциаты способны переходить в амилоидоподобные структуры и агрегировать с частичной или полной потерей нативных свойств.

Максимальный выход продукта при производстве рекомбинантных белков обеспечивается использованием высококопийных плазмид, микроорганизмов-суперпродуцентов и оптимизацией условий их культивирования. Интенсивный синтез целевого белка приводит к его значительному накоплению в клетках продуцента – до 30% биомассы, что запускает агрегационный механизм защиты бактериальной клетки, приводящий к формированию «телец включения», состоящих как из частично денатурированных, так и нативных форм рекомбинантного белка [6, 7].

#### Тельца включения

Тельца включения представляют собой клеточные инкременты, видимые в световой микроскоп в поляризованном свете как опалесцирующие сферические или овоидные образования, располагающиеся в цитозоле клетки в центре или по полюсам, а иногда в виде внутриклеточных цепочек. Их размеры колеблются от 0,2 до 2,5 мкм, иногда занимая почти весь объем бактериальной клетки.

Образование телец включения – динамический процесс, при котором синтезированный белок может либо переходить в растворимую форму, либо накапливаться в виде инкрементов в зависимости от режима культивирования [8]. Было показано, что белковые агрегаты в тельцах включения представлены в виде амилоидоподобных структур, соответственно богатых содержанием бета-складчатых участков [9]. Помимо рекомбинантного белка в различных конформационных состояниях, тельца включения содержат также небольшие количества таких клеточных компонентов, как бактериальные мембраны, белки цитоплазмы, рибосомы, нуклеиновые кислоты.

Поскольку тельца включения являются наиболее массивными и плотными клеточными образованиями, они без особого труда могут быть выделены из клеток простым центрифугированием после клеточного лизиса. Лизис биомассы бактериальных клеток проводится разнообразными методами: замораживанием–оттаиванием, ультразвуковой дезинтеграцией, дезинтеграцией под давлением, под действием ферментов. Изолированные тельца включения в дальнейшем промывают растворами детергентов (Тритон X-100) для частичной очистки, в основном от небелкового поверхностного балласта, подготавливая тельца к солиubilизации.

При образовании в бактериальной клетке «неклассических» телец включения, сформированных белками в нативной форме, солиubilизацию проводят в неденатурирующих условиях. В некоторых случаях достаточно растворить тельца в буферном растворе, чтобы получить раствор нативного белка [10].

В других случаях необходимо введение солиubilизирующих агентов в умеренных концентрациях либо органических

растворителей, таких как *n*-пропанол, ДМСО или детергенты [11, 12].

Для солиubilизации «истинных» телец включения применяют довольно высокие концентрации денатурирующих агентов. К ним относятся мочевины и гуанидинхлорид (GdnHCl).

Мочевина оказывает более слабое воздействие на белок. Как правило, ее требуется в 2–2,5 раза больше, чем гуанидинхлорида, для достижения того же эффекта [13], и ее концентрация в растворе может достигать 9M. Мочевина взаимодействует с водой путем образования множественных водородных связей и находится в растворе преимущественно в виде гидратированных цепочек и кластеров, дополнительно образуя межмолекулярные ассоциаты в гидратной оболочке молекулы белка [14]. Взаимодействие мочевины с белковой глобулой происходит по гидрофильным зонам макромолекулы [15] и затрагивает в основном лабильные участки поверхности глобулы, не оказывая воздействия на вторичную структуру белка. При высоких концентрациях она выступает в роли космотропного агента [16].

В отличие от мочевины, GdnHCl является более сильным денатурантом, что связано с его ионной природой и способностью диссоциировать в растворе. Он связывается с неполярными участками поверхности глобулы, образованными остатками триптофана, тирозина и фенилаланина, за счет гидрофобных взаимодействий [17]. Одновременно GdnHCl образует водородные связи с водой и полярными функциональными группами белка, снижая способность глобулы к самостоятельной сборке и увеличивая склонность к гидратации полипептидной цепи [18]. При использовании в качестве денатуранта GdnHCl необходимо учитывать некоторые особенности его взаимодействия с белками. GdnHCl при небольших концентрациях может стабилизировать белки [19, 20] за счет того, что он снимает существующие напряжения, обусловленные электростатическим взаимодействием заряженных групп на его поверхности. Вместе с тем при более высоких концентрациях этот денатурант может оказывать на белки и агрегирующее действие [21]. Полагают, что денатурация белков под действием мочевины протекает с образованием интермедиатов, тогда как денатурация под действием GdnHCl – одностадийная [22].

При использовании высоких концентраций мочевины следует учитывать возможность ее спонтанного гидролиза до иона аммония и цианат-иона. Последний способен вступать в реакцию карбамилрования с аминокеттогруппами белка, изменяя его свойства. Наиболее интенсивно этот процесс проходит при физиологических значениях pH буферных растворов (pH 7) и повышенной температуре, а также при длительном (несколько дней) хранении раствора мочевины [23].

### **Факторы, влияющие на эффективность ренатурации белка**

Целостность белка, а также способность к восстановлению нативной конформации определяется его первичной структурой. Такие процессы в кодирующих генах, как мутации, делеции, рекомбинации, вставки и др., могут препятствовать формированию активной структуры белка и определяются, а также контролируются на стадии создания рекомбинантного продукта (молекулярный дизайн, подбор вектора, штамма продуцента, условий культивирования и др.).

Зависимость ренатурации от характера белка и многих параметров окружения затрудняет достижение воспроизводимости. Несмотря на достигнутое понимание принципов ренатурации, процесс поиска оптимального метода остается достаточно эмпирическим и сводится к подбору состава ренатурирующего буфера, физико-химических условий рефолдинга, поиску эффективной концентрации обрабатываемого белка и применению надлежащих биотехнологических и биохимических методов, соответствующих степени лабильности продукта и его уникальным свойствам.

К примеру, из общих соображений процесс ренатурации стараются вести при пониженной температуре, так как ее повышение теоретически приводит к дестабилизации структуры белка и экспонированию на поверхности гидрофобных участков молекул, что чревато их агрегацией. Однако установлено, что некоторые белки могут ренатурировать при температуре более 30°C [24].

Отметим основные факторы, требующие учета при проведении ренатурации, и наиболее распространенные методические приемы для предупреждения денатурации. К нарушению целостности белковой структуры может приводить процесс замораживания–оттаивания. При этом происходят такие явления, как перекристаллизация, образование поверхностей раздела между льдом и жидкостью, адсорбция и криоконцентрирование белков и солей буфера, что необходимо учитывать при хранении рекомбинантных белков [25].

Значимым фактором в случае некоторых белков является повышение в реакционной системе давления. Исследования по влиянию давления на структуру белков проведены еще в середине 1940-х гг. Было отмечено, что повышение давления может способствовать процессу ренатурации белков, причем повышение температуры в этом случае до 60–65°C положительно влияло на восстановление структуры белков, тогда как пониженные температуры, наоборот, отрицательно сказывались на процессе. Существенное влияние оказывал и pH буферного раствора. Вдали от изоэлектрической точки создавались оптимальные условия для рефолдинга белка при создании в системе давления.

Проводя солиubilизацию телец включения под давлением, достигающим 2,4 Кбар, при температуре –9°C в случае выделения рекомбинантного белка эндостатина была достигнута эффективная солиubilизация телец включения, а снижение давления до 0,4 Кбар с одновременным повышением температуры до 20°C способствовало эффективной ренатурации белка [26].

При рефолдинге белка стараются минимизировать количество солей, чтобы не препятствовать сопутствующим процессам предочистки, например ионообменной хроматографии. Также неоправданное увеличение концентрации солей может привести к экранированию зарядов на поверхности белка, уменьшая силы отталкивания между белковыми молекулами, что увеличивает склонность к агрегации [27].

Величина pH и природа буферного раствора влияют на общий заряд молекулы, степень ионизации поверхностных группировок, водородных связей, степень гидратированности, экспрессию на поверхности молекулы гидрофобных либо гидрофильных группировок, т.е. на факторы, определяющие равновесие между денатурированной формой, переходными состояниями и нативной структурой. Как из-

вестно, при значении рН буферного раствора, близком к изоэлектрической точке белка, происходит снижение биологической активности и склонности макромолекул к ассоциации и агрегации. Так, при различных значениях рН процесс агрегации бычьего сывороточного альбумина протекал различными путями в зависимости от рН раствора. При значениях рН, близких к  $pI$  белка и ниже, процесс идет по пути образования аморфных агрегатов, а в более щелочных условиях – с образованием амилоидоподобных фибрилл, образованных  $\beta$ -складчатыми структурами, либо смешанных структур, в зависимости от величины щелочного сдвига рН буферного раствора [28].

Поэтому при выборе значения рН раствора для ренатурации необходимо иметь данные о изоэлектрической точке, рН-профилях растворимости и биологической активности целевого белка.

Способствовать агрегации белка могут примеси, такие как нуклеиновые кислоты, белки продуцента. После предварительной промывки телец раствором, содержащим ПАВ (n-лаурилсаркозин, лаурил глутамат [29, 30]), и солюбилизации телец включения проводят предпочтительную солюбилизацию белка в денатурирующих условиях методами гель-фильтрации, ионообменной хроматографии и другими возможными методами, избавляясь от нежелательного балласта. Рекомендуется в денатурирующий раствор вводить хелатирующие агенты типа ЭДТА для устранения ионов двухвалентных металлов и ингибирования металлопротеаз, способствующих деградации белка в ходе последующей ренатурации.

Основные потери целевого белка при ренатурации происходят при его агрегировании. Гидрофобные, ионные, водородные, ковалентные межмолекулярные взаимодействия часто приводят к необратимой денатурации белка при его агрегировании. В связи с этим важную роль играет подбор оптимального соотношения белкового раствора и ренатурирующего буфера. Иногда оно достигает 1:100 и более. При этом немаловажную роль играет скорость и метод введения буфера для ренатурации в белковый раствор. Для склонных к агрегации белков рекомендуется максимальная скорость разбавления.

Введение в буферный раствор для ренатурации различных низкомолекулярных веществ может приводить к стабилизации нативной структуры белка. Так, использование в ходе очистки и ренатурации поверхностно-активных веществ препятствует образованию агрегатов, возникающих при межмолекулярном гидрофобном взаимодействии, стабилизируя нативную структуру белка.

Эффективным солюбилизующим агентом (помимо додецилсульфата натрия) является саркозил – сильный анионный детергент. Обычно для растворения телец включения достаточно 0,3%-го раствора саркозила. Примеси Тритона Х-100, формирующего большие мицеллы, способствуют поглощению саркозила с образованием смешанных мицелл. Вследствие этого количество вводимого в раствор саркозила должно быть увеличено. Снижение концентрации саркозила до 0,01% приводит к диссоциации мицеллярного комплекса и формированию нативной конформации белка. Также, связываясь с гидрофобными участками белковой глобулы, низкие концентрации саркозила эффективно пре-

дотвращают ассоциацию и агрегацию белка. Таким образом, саркозил выступает в качестве «химического шаперона», а последующее освобождение белкового раствора от него возможно с помощью катионообменника.

В качестве катионного детергента для солюбилизации и рефолдинга белка показано использование хлорида цетилтриметиламмония [31, 32].

Использование ПАВ также возможно, однако они часто затрудняют дальнейшую очистку белка из-за склонности к мицеллообразованию [33]. Существует ряд других низкомолекулярных веществ-антиагрегантов (аргинин, пролин, циклодекстрин, полиэтиленгликоль) и стабилизаторов, в целом способствующих процессу фолдинга (аммония сульфат, магния хлорид, глицин, полиольные соединения, такие как глицерин, сорбитол) [34]. Например, применение в ренатурирующем растворе 20% глицерина позволило успешно выделить рекомбинантный белок *Mycobacterium tuberculosis* PPE17 [35].

Следует отметить аргинин и его производные, которые используют для подавления агрегации, а также межмолекулярных взаимодействий в ходе ренатурации белка и как стабилизатор белковой структуры при хранении белкового раствора [36, 37]. Пролин обладает криопротекторными, термостабилизирующими и антиагрегирующими свойствами [38].

Подбор протекторов и их количество индивидуально и может быть определено только экспериментальным путем.

Известно, что рефолдинг некоторых белков лучше идет *in vivo* в присутствии N-концевого пропептида и его добавление в ренатурирующую систему увеличивает выход нативного белка [39].

Прямое действие на процесс рефолдинга оказывают ферменты, катализирующие образование нативной структуры белка, а также шапероны [40–44].

Нативная структура множества белков поддерживается внутримолекулярными дисульфидными мостиками, образованными между остатками цистеина и цистина. Образование межмолекулярных дисульфидных связей приводит к накоплению в растворе олиго- и полимеров белка с последующей его агрегацией и преципитацией. Внутримолекулярные образования неправильно связанных дисульфидных групп приводят к нестабильности белковой молекулы. Наличие дитиотреитола, меркаптоэтанола в ренатурирующем буферном растворе позволяет предотвратить межмолекулярные сшивки и образование дефектных форм белка. Замыкание внутримолекулярных дисульфидных связей происходит под действием кислорода воздуха при снижении концентрации восстановителей. Переформирование дисульфидных мостиков проводят в буферном растворе, обладающем окислительно-восстановительным потенциалом, создаваемым за счет содержания окисленной и восстановленной форм глутатиона, а также парами: цистеин/цистин, цистеамин/цистамин, дитиотреитол/глутатион [45–47].

### Методы ренатурации

Процесс ренатурации достигается решением нескольких последовательных задач:

- изменение условий белкового окружения;
- переконформация белковой структуры;
- стабилизация нативной формы белка.

В лабораторной практике применяют *метод диализа*. В ходе простого диализа происходит постепенное снижение концентрации денатуранта при неизменной концентрации белка. Процесс рефолдинга занимает длительное время, при котором частично ренатурированные белковые молекулы взаимодействуют своими гидрофобными участками, что нередко приводит к агрегации белка после снижения концентрации денатуранта до некоторого критического уровня. Эту проблему решают, применяя *ступенчатый диализ* [48–51].

*Метод разведения* основан на снижении концентрации денатурирующего агента путем многократного разведения белкового раствора ренатурирующим буфером. Достижимая малая концентрация белка позволяет минимизировать время рефолдинга, а также избежать агрегирования белковых молекул.

Для этого метода также применим *ступенчатый вариант*, когда снижение концентрации белка и денатурирующего агента производят дискретно. Это снижает количество используемого буферного раствора и повышает выход нативного материала [52].

Техника разведения предполагает несколько вариантов:

- прямое (струйное либо капельное) разведение солюбилизованного белка ренатурирующим буферным раствором. Этот вариант позволяет медленно снижать концентрацию денатуранта, способствуя созданию мягких условий для ренатурации. Остаточная концентрация денатуранта не дает белку агрегировать, хотя при достижении минимальной критической его (денатуранта) концентрации может возникнуть опасность агрегации белка, но, в то же время, увеличивающийся объем раствора препятствует этому процессу;
- реверсивное разведение, при котором белковый раствор вводится при перемешивании в буферный раствор для ренатурации [53];
- моментальное разведение предполагает быстрое введение белкового раствора в ренатурирующий буфер. При этом минимизируется риск агрегации белка, а также экономится время процесса;
- медленное (капельное) введение белка в ренатурирующий раствор способствует не только снижению агрегации белка, но и его фолдингу в максимально благоприятных условиях [54].

*Метод температурного шока, или «скачка»*. Изменяя температуру раствора в ходе ренатурации, можно добиться эффективного выделения нативного продукта. В работе [23] были исследованы температурные условия ренатурации бычьей карбоангидразы. Применяя метод «температурного скачка», удалось увеличить выход активного фермента с 37% (ренатурация при 4°C) до 95%, быстро нагревая раствор до 36°C в течение 30 минут.

*Метод ренатурации в щелочных условиях*. В некоторых случаях использование буферных растворов с высоким значением (pH >12) при низкой концентрации денатурирующих веществ способствует более эффективному рефолдингу белка [55, 56].

*Метод гель-фильтрации* позволяет не только сменить буферный раствор, но и провести дополнительную очистку продукта от балласта [57–61]. У данного метода есть свои недостатки, такие как необходимость концентрировать рас-

твор перед нанесением на колонку, что может приводить к необратимой денатурации белка. Данный метод, как правило, продолжительный и проводится в основном на холоде.

*Метод сорбции* целевого белка на различные поверхности дает возможность устранить протеолитическую деградацию белка, распределить его молекулы, не допуская возникновения локального повышения концентрации и, соответственно, препятствуя его агрегации, а также требует минимума времени на его исполнение. Иммуобилизация на ионообменных носителях [62–65], адсорбционная, гидрофобная [66], обращеннофазовая [67, 68] и аффинная [69–71] хроматографии с успехом используются для эффективной ренатурации белка.

*Рефолдинг в обратных мицеллах* представляет собой процесс разобщения белковых молекул и ренатурацию в условиях внутренней, гидрофильной области мицеллы ПАВ, сформированной объединением полярных групп в среде неполярного вещества. Малое число агрегации приводит к формированию обратных мицелл меньшего размера, чем мицелл водных растворов ПАВ. Эффективность данного метода была продемонстрирована в процессе ренатурации бычьей панкреатической рибонуклеазы А в качестве модели. Денатурированная рибонуклеаза полностью восстанавливала активность внутри обращенных мицелл в течение 24 ч после добавления смеси восстановленного и окисленного глутатиона для повторного окисления дисульфидных связей [72].

*Рефолдинг в водной двухфазной системе (ATPS – Aqueous Two-Phase Systems)*, например ПЭГ–фосфат, продемонстрирован на примере ренатурации лакказы, металлсодержащего фермента. Результаты экспериментов показали, что эффективность рефолдинга достигала 90%, а введение добавок, таких как L-цистеин, окисленная форма глутатиона, цистамин и ионы  $\text{Cu}^{+2}$ , улучшало этот процесс почти до 100% [73].

Наиболее оптимальным методом ренатурации и смены буферного раствора является *ультрафильтрация в тангенциальном потоке* (например, на полых волокнах). Метод легко масштабируется, имеется возможность контроля скорости изменения концентрации денатурирующих агентов, требует минимального количества времени по сравнению с другими методами, позволяет проводить ренатурацию в мягких условиях, а также концентрировать ренатурат до необходимой степени в конце процесса. Возможность использования реверсивного снятия слоя белка на ультрафильтрационной мембране способна свести к минимуму его потери в отличие от ультрафильтрации на ячейках.

Уменьшение концентрации денатуранта (мочевины) можно осуществлять *ферментативной деградацией* последней с помощью уреазы [74]. Метод позволяет проводить ренатурацию без изменения объема раствора.

Для лабораторных целей используется метод ренатурации с применением *иммобилизованных на носителе шаперонинов*. Конечно, данный метод дорог для промышленного применения и используется только как модельная система или в ходе лабораторного выделения ценных в исследовательском отношении белков [75–79].

В лабораторной практике для выбора подходящего метода ренатурации применяется *microfluidic chips*, где измене-



ние концентрации денатуранта идет в изменяющемся ламинарном потоке. Коммерческие фирмы выпускают наборы, содержащие буферные растворы для ренатурации, включающие разнообразные по составу компоненты, для скрининга условий рефолдинга белков.

### Контроль нативности белков

Для эффективного подбора ренатурирующих условий необходим ряд методов, позволяющих оценить степень нативности ренатурируемого продукта.

Основными характеристиками нативности белка являются его пространственная структура, характеризующаяся возможным наличием дисульфидных мостиков и количеством доменов, наличие биологической (антигенной, ферментативной и др.) активности, а также доля ди-, тримерных или других его форм.

Наиболее объективной оценкой степени нативности белка является определение удельной активности (для ферментов) или сорбционной (сорбирующей способности) белка, например для таких белков, как иммуноглобулины, альбумины, авидин, белок А. Расчет удельной активности возможен при достижении максимальной чистоты препарата, либо должно быть точно известно количество посторонних мешающих определению концентрации белка примесей. Сорбционные (сорбирующие) свойства белков оценивают с помощью аффинной, адсорбционной хроматографии, а степень связывания белок–субстрат эффективно оценивать методом поверхностного плазмонного резонанса, основанном на использовании полного внутреннего отражения электромагнитных волн от границы раздела двух сред.

В тех случаях, когда активной формой белка является его ди- или тримерная форма, с успехом используются такие методы, как ПЛАГ-электрофорез в неденатурирующих условиях, т.е. при отсутствии меркаптоэтанола либо стадии прогревания образца, а также гель-фильтрация, позволяющая оценить долю мономерной и других форм белка.

К методам определения степени нативности белковой структуры можно отнести определение наличия простетических групп, ионов металлов, входящих в активный центр многих ферментов, а также определение других специфических свойств различных белков. Спектр этих методов велик, как и разнообразие самих белковых структур.

Сохранение нативной структуры белка представляет сложную задачу, касающуюся не только биотехнологических, но и медицинских проблем. Агрегация белков сопровождается формированием в тканях человека и животных внутриклеточных нерастворимых амилоидов, прионов и других структур, вызывающих такие заболевания, как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, прионные энцефалопатии, офтальмологические болезни. Поэтому задача восстановления биологически активных белков, изучения их структуры и функций остается чрезвычайно актуальной в процессах создания и разработки новых терапевтических препаратов.

### Литература

1. Фёдоров АН. Биосинтетическое сворачивание белков. Дисс. ... доктора биологических наук. М.: Рос. ун-т дружбы народов; 2009.
2. Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastrò D, Gerisch G, Baumeister W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1209-13. DOI: 10.1126/science.1076184
3. Ptitsyn OB. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 1995;47:83-229. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60546-x
4. Uversky VN, Ptitsyn OB. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol.* 1996;225(1):215-228.
5. Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 2002;11(4):739-756.
6. Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):179-85. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.02.007
7. Wu W, Xing L, Zhou B, Lin Z. Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2011 Feb 15;10:9. DOI: 10.1186/1475-2859-10-9
8. Carrio MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol.* 2002 Jun 13;96(1):3-12. DOI: 10.1016/s0168-1656(02)00032-9
9. Carrio M, Gonzalez-Montalban N, Vera A, Villaverde A, Ventura S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J Mol Biol.* 2005 Apr 15;347(5):1025-37. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.02.030
10. Lu SC, Lin SC. Recovery of active N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from inclusion bodies by solubilization with non-denaturing buffers. *Enzyme Microb Technol.* 2012 Jan 5;50(1):65-70. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.09.010
11. Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog.* 2005 Mar-Apr;21(2):632-9. DOI: 10.1021/bp0497839
12. Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol.* 2014 Sep 15;5:486. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00486
13. Hédoux A, Krenzlin S, Paccou L. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes. *Phys Chem Chem Phys.* 2010 Oct 28;12(40):13189-96. DOI: 10.1039/c0cp00602e
14. Soper AK, Castner EW, Luzar A. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? *Biophys Chem.* 2003 Sep;105(2-3):649-66. DOI: 10.1016/s0301-4622(03)00095-4
15. Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5142-7. DOI: 10.1073/pnas.0930122100
16. Фенелонов ВБ, Пармон ВН. Введение в физическую химию формирования текстуры гетерогенных катализаторов. Промышленный катализ в лекциях. М.: Калвис; 2005, 132 с.
17. Mason PE, Neilson GW, Enderby JE, et al. The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. *J Am Chem Soc.* 2004;126:11462-70.
18. Миляева ОЮ. Динамические поверхностные свойства растворов комплексов белков и полиэлектролитов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. СПб., 2015, 140 с.
19. Monera OD, Kay CM, Hodges RS. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci.* 1994;3:1984-1991.
20. Bhuyan AK. Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* 2002;41:13386-13394. DOI: 10.1021/bi020371n
21. Кузнецова ИМ. Механизмы возникновения и свойства промежуточных, неправильносвернутых и агрегированных форм белков. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. СПб., 2006, 303 с.

22. Muzammil S, Kumar Y, Tayyab S. Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins*. 2000 Jul 1;40(1):29-38.
23. Практическая химия белка. Под ред. А.Дарбре. М.: Мир; 1989, 623 с.
24. Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein folding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*. 1996;5:517-23.
25. Strambini GB, Connelly M. Protein stability in ice. *Biophys J*. 2007 Mar 15; 92(6):2131-8. DOI: 10.1529/biophysj.106.099531
26. Chura-Chambi RM, Cordeiro Y, Malavasi NV, Lemke LS, Rodrigues D, Morganti L. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. *Process Biochem*. 2013;48:250-259.
27. Olsen SN, Andersen KB, Randolph TW, Carpenter JF, Westh P. Role of electrostatic repulsion on colloidal stability of *Bacillus halmapalus* alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1794(7):1058-65. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.010
28. Vetri V, D'Amico M, Fodera V, Leone M, Ponzoni A, Sberveglieri G, Militello V. Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Apr 1;508(1):13-24. DOI: 10.1016/j.abb.2011.01.024
29. Burgess RR. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods Enzymol*. 1996;273:145-9. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)73014-8
30. Kudou M, Ejima D, Sato H, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K. Refolding singlechain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein Expr Purif*. 2011 May;77(1):68-74. DOI: 10.1016/j.pep.2010.12.007
31. Puri NK, Crivelli E, Cardamone M, Fiddes R, Bertolini J, Ninham B, Brandon MR. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *E. coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *Biochem J*. 1992;285:871-9.
32. Song J. Insight into insoluble proteins with pure water. *FEBS Lett*. 2009 Mar 18;583(6):953-9. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.02.022
33. Santos SF, Zanette D, Fischer H, Itri R. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J Colloid Interface Sci*. 2003 Jun 15;262(2): 400-8.
34. Susan Mir Najd Gerami, Safar Farajnia, Feridoun Mahboudi. Co-solute assistance in refolding of recombinant proteins. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(53):10811-16.
35. Najaf A, Tafaghod M, Sankian M, et al. Cloning, Expression, and Refolding of PPE17 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a Promising Vaccine Candidate. *Iran J Med Sci*. 2019;44(1).
36. Creighton TE. Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series*. New York, 1986, Vol. 39, pp. 249-257.
37. Suttner J, Dyr JE, Hamsikova E, Novak J, Vonka V. Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies using a strong anion exchanger. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994 Jun 3;656(1): 123-6.
38. Kweon DH, Lee DH, Han NS, Seo JH. Solid-phase refolding of cyclodextrin glycosyltransferase adsorbed on cation-exchange resin. *Biotechnol Prog*. 2004 Jan-Feb;20(1):277-83. DOI: 10.1021/bp0341895
39. Серкина АВ, Шевелев АВ, Честухина ГГ. Структура и функции предшественников бактериальных протеиназ. *Биоорганическая химия*. 2001;27(5): 323-346.
40. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng*. 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
41. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3576-3578.
42. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
43. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. 2000;16:169-172.
44. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol*. 1999;17:187-191.
45. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:497-501.
46. De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 1998;9:157-163.
47. De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol*. 1999;309:217-236.
48. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif*. 2003;28:1-8.
49. Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8979-87. DOI: 10.1074/jbc.M212247200
50. Ho JGS, Middelberg APJ, Ramage P, Kocher HP. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Sci*. 2003;12:708-716.
51. Liu W, Cellmer T, Keerl D, Prausnitz JM, Blanch HW. Interactions of lysozyme in guanidinium chloride solutions from static and dynamic light-scattering measurements. *Biotechnol Bioeng*. 2005 May 20;90(4):482-90. DOI: 10.1002/bit.20442
52. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2000 Mar; 18(2):182-92.
53. Gribskov M, Burgess RR. Overexpression and purification of the sigma70 subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Gene*. 1983;26:109-118.
54. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body protein. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
55. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
56. Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, Totey SM, Panda AK. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 1998 Sep-Oct;14(5):722-8. DOI: 10.1021/bp980071q
57. Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett*. 1994;345:125-130.
58. Batas B, Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng*. 1996 Apr 5;50(1):16-23.
59. Schlegl R, Iberer G, Machold C, Necina R, Jungbauer A. Continuous matrix-assisted refolding of proteins. *J Chromatogr A*. 2003;1009:119-132.
60. Gu Z, Weidenhaupt M, Ivanova N, Pavlov M, Xu B, Su ZG, et al. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif*. 2002 Jun;25(1):174-9. DOI: 10.1006/prep.2002.1624
61. Lanckriet H, Middelberg AP. Continuous chromatographic protein refolding. *J Chromatogr A*. 2004 Jan 2;1022(1-2):103-13. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.09.013
62. Lange C, Rudolph R. Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Jun;10(4):408-14. DOI: 10.2174/138920109788488851
63. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo J, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*. 2004;20:1301-1308.

64. Troitzsch RZ, Tulip PR, Crain J, Martyna GJ. A simplified model of local structure in aqueous proline amino acid revealed by first-principles molecular dynamics simulations. *Biophys J*. 2008;95:5014-5020.
65. Li M, Zhang G, Su Z. Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *J Chromatogr A*. 2002;959:113-120.
66. Wang S, Gao D, Wang W, Zhang N, Wang L. Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Core Streptavidin Using Single-step High-performance Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019;24:658-665.
67. Ling M, Xu X, Shi F, Zhu Y, Long N. Refolding of recombinant human interleukin-2 by reverse phase high performance liquid chromatography. *Chin J Biotechnol*. 1997;13:180-183.
68. Li M, Su Z-G, Janson J-C. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Exp. and Purif*. 2003;33:1-10.
69. Glynou K, Ioannou PC, Christopoulos TK. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*. 2003 Feb;27(2):384-90. DOI: 10.1016/s1046-5928(02)00614-9
70. Yin SM, Zheng Y, Tien P. On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag. *Protein Expr Purif*. 2003;32:104-109.
71. Zahn R, von S.C, Wuthrich K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett*. 1997;417:400-404.
72. Hagen AJ, Hatton TA, Wang DI. Protein refolding in reversed micelles. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(2):285-294.
73. Sánchez-Trasvina C, Mayolo-Deloisa K, González-Valdez J, Rito-Palomares M. Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives. *J Chromatogr A*. 2017 Jul 21;1507:25-31. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.023
74. Okada J, Maruyama T, Motomura K, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, et al. Enzyme-mediated protein refolding. *Chem Commun (Camb)*. 2009;46:7197-7199.
75. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng*. 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
76. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94(8):3576-8. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3576
77. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
78. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2000;16:169-172.
79. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol*. 1999;17:187-191.
5. Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*. 2002;11(4):739-756.
6. Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):179-85. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.02.007
7. Wu W, Xing L, Zhou B, Lin Z. Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2011 Feb 15;10:9. doi: 10.1186/1475-2859-10-9
8. Carrio MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol*. 2002 Jun 13;96(1):3-12. DOI: 10.1016/s0168-1656(02)00032-9
9. Carrio M, Gonzalez-Montalban N, Vera A, Villaverde A, Ventura S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J Mol Biol*. 2005 Apr 15;347(5):1025-37. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.02.030
10. Lu SC, Lin SC. Recovery of active N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from inclusion bodies by solubilization with non-denaturing buffers. *Enzyme Microb Technol*. 2012 Jan 5;50(1):65-70. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.09.010
11. Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog*. 2005 Mar-Apr;21(2):632-9. DOI: 10.1021/bp0497839
12. Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol*. 2014 Sep 15;5:486. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00486
13. Hédoux A, Krenzlin S, Paccou L. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes. *Phys Chem Chem Phys*. 2010 Oct 28; 12(40):13189-96. DOI: 10.1039/c0cp00602e
14. Soper AK, Castner EW, Luzar A. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? *Biophys Chem*. 2003 Sep;105(2-3):649-66. DOI: 10.1016/s0301-4622(03)00095-4
15. Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5142-7. DOI: 10.1073/pnas.0930122100
16. Fenelonov VB, Parmon VN. Vvedenie v fizicheskuyu khimiyu formirovaniya tekstury geterogennykh katalizatorov. *Promyshlennyi kataliz v lektsiyakh*. Moscow: "Kalvis" Publ.; 2005, 132 p. (In Russian).
17. Mason PE, Neilson GW, Enderby JE, et al. The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. *J Am Chem Soc*. 2004;126:11462-70.
18. Milyaeva OYu. Dinamicheskie poverkhnostnye svoystva rastvorov kompleksov belkov i polielektrolitov. *Dissertatsiya na soiskanie uchenoi stepeni kandidata khimicheskikh nauk*. St. Petersburg, 2015, 140 p. (In Russian).
19. Monera OD, Kay CM, Hodges RS. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci*. 1994;3:1984-1991.
20. Bhuyan AK. Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry*. 2002;41:13386-13394. DOI: 10.1021/bi020371n
21. Kuznetsova IM. Mekhanizmy vozniknoveniya i svoystva promezhutochnykh, nepravil'nosvernutykh i agregirovannykh form belkov. *Diss*. St. Petersburg, 2006, 303 p. (In Russian).
22. Muzammil S, Kumar Y, Tayyab S. Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins*. 2000 Jul 1;40(1):29-38.
23. *Prakticheskaya khimiya belka*. Edited by A.Darbre. Moscow: "Mir" Publ.; 1989, 623 p. (In Russian).
24. Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein folding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*. 1996;5:517-23.
25. Strambini GB, Connelli M. Protein stability in ice. *Biophys J*. 2007 Mar 15;92(6):2131-8. DOI: 10.1529/biophysj.106.099531

## References

1. Fedorov AN. Biosinteticheskoe svorachivanie belkov. *Diss*. Moscow: RUDN University; 2009. (In Russian).
2. Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1209-13. DOI: 10.1126/science.1076184
3. Ptitsyn OB. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem*. 1995;47:83-229. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60546-x
4. Uversky VN, Ptitsyn OB. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol*. 1996;225(1):215-228.

26. Chura-Chambi RM, Cordeiro Y, Malavasi NV, Lemke LS, Rodrigues D, Morganti L. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. *Process Biochem.* 2013;48: 250-259.
27. Olsen SN, Andersen KB, Randolph TW, Carpenter JF, Westh P. Role of electrostatic repulsion on colloidal stability of *Bacillus halmapalus* alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1794(7):1058-65. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.010
28. Vetri V, D'Amico M, Fodera V, Leone M, Ponzone A, Sberveglieri G, Militello V. Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 2011 Apr 1;508(1):13-24. DOI: 10.1016/j.abb.2011.01.024
29. Burgess RR. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods Enzymol.* 1996;273:145-9. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)73014-8
30. Kudou M, Ejima D, Sato H, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K. Refolding singlechain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein Expr Purif.* 2011 May;77(1):68-74. DOI: 10.1016/j.pep.2010.12.007
31. Puri NK, Crivelli E, Cardamone M, Fiddes R, Bertolini J, Ninham B, Brandon MR. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *E. coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *Biochem J.* 1992;285:871-9.
32. Song J. Insight into insoluble proteins with pure water. *FEBS Lett.* 2009 Mar 18;583(6):953-9. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.02.022
33. Santos SF, Zanette D, Fischer H, Itri R. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J Colloid Interface Sci.* 2003 Jun 15;262(2): 400-8.
34. Susan Mir Najd Gerami, Safar Farajnia, Feridoun Mahboudi. Co-solute assistance in refolding of recombinant proteins. *African Journal of Biotechnology.* 2011;10(53):10811-16.
35. Najaf A, Tafaghod M, Sankian M, et al. Cloning, Expression, and Refolding of PPE17 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a Promising Vaccine Candidate. *Iran J Med Sci.* 2019;44(1).
36. Creighton TE. Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series.* New York, 1986, Vol. 39, pp. 249-257.
37. Suttner J, Dyr JE, Hamsikova E, Novak J, Vonka V. Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies using a strong anion exchanger. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994 Jun 3; 656(1):123-6.
38. Kweon DH, Lee DH, Han NS, Seo JH. Solid-phase refolding of cyclodextrin glycosyltransferase adsorbed on cation-exchange resin. *Biotechnol Prog.* 2004 Jan-Feb;20(1):277-83. DOI: 10.1021/bp0341895
39. Serkina AV, Shevelev AB, Chestukhina GG. Structures and Functions of Precursors of Bacterial Proteases. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2001;27(5): 285-305. (In Russian).
40. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng.* 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
41. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3576-3578.
42. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A.* 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
43. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. 2000;16:169-172.
44. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol.* 1999;17:187-191.
45. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:497-501.
46. De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 1998;9:157-163.
47. De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* 1999;309:217-236.
48. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 2003;28:1-8.
49. Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):8979-87. DOI: 10.1074/jbc.M212247200
50. Ho JGS, Middelberg APJ, Ramage P, Kocher HP. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Sci.* 2003;12:708-716.
51. Liu W, Cellmer T, Keerl D, Prausnitz JM, Blanch HW. Interactions of lysozyme in guanidinium chloride solutions from static and dynamic light-scattering measurements. *Biotechnol Bioeng.* 2005 May 20;90(4):482-90. DOI: 10.1002/bit.20442
52. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2000 Mar;18(2):182-92.
53. Gribskov M, Burgess RR. Overexpression and purification of the sigma 70 subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Gene.* 1983;26:109-118.
54. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body protein. *J Biosci Bioeng.* 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
55. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
56. Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, Totey SM, Panda AK. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 1998 Sep-Oct;14(5):722-8. DOI: 10.1021/bp980071q
57. Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett.* 1994;345:125-130.
58. Batas B, Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng.* 1996 Apr 5;50(1):16-23.
59. Schlegl R, Iberer G, Machold C, Necina R, Jungbauer A. Continuous matrix-assisted refolding of proteins. *J Chromatogr A.* 2003;1009:119-132.
60. Gu Z, Weidenhaupt M, Ivanova N, Pavlov M, Xu B, Su ZG, et al. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from, *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2002 Jun;25(1):174-9. DOI: 10.1006/prep.2002.1624
61. Lanckriet H, Middelberg AP. Continuous chromatographic protein refolding. *J Chromatogr A.* 2004 Jan 2;1022(1-2):103-13. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.09.013
62. Lange C, Rudolph R. Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009 Jun;10(4):408-14. DOI: 10.2174/138920109788488851
63. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo J, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog.* 2004;20:1301-1308.
64. Troitzsch RZ, Tulip PR, Crain J, Martyna GJ. A simplified model of local structure in aqueous proline amino acid revealed by first-principles molecular dynamics simulations. *Biophys J.* 2008;95:5014-5020.
65. Li M, Zhang G, Su Z. Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *J Chromatogr A.* 2002;959:113-120.
66. Wang S, Gao D, Wang W, Zhang N, Wang L. Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Core Streptavidin Using Single-step High-perfor-

- mance Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019;24:658-665.
67. Ling M, Xu X, Shi F, Zhu Y, Long N. Refolding of recombinant human interleukin-2 by reverse phase high performance liquid chromatography. *Chin J Biotechnol*. 1997;13:180-183.
68. Li M, Su Z-G, Janson J-C. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Exp. and Purif*. 2003;33:1-10.
69. Glynn K, Ioannou PC, Christopoulos TK. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*. 2003 Feb;27(2):384-90. DOI: 10.1016/s1046-5928(02)00614-9
70. Yin SM, Zheng Y, Tien P. On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag. *Protein Expr Purif*. 2003;32:104-109.
71. Zahn R, von S.C, Wuthrich K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett*. 1997;417:400-404.
72. Hagen AJ, Hatton TA, Wang DI. Protein refolding in reversed micelles. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(2):285-294.
73. Sánchez-Trasvina C, Mayolo-Deloisa K, González-Valdez J, Rito-Palomares M. Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives. *J Chromatogr A*. 2017 Jul 21;1507:25-31. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.023
74. Okada J, Maruyama T, Motomura K, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, et al. Enzyme-mediated protein refolding. *Chem Commun (Camb)*. 2009;46:7197-7199.
75. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng*. 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
76. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94(8):3576-8. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3576
77. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
78. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2000;16:169-172.
79. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol*. 1999;17:187-191.

**Информация об авторах:**

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: tvr\_obolensk@mail.ru

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: panfera62@mail.ru

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: biketov@mail.ru

**Information about authors:**

Tatiana V. Reshetnyak, researcher, department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: tvr\_obolensk@mail.ru

Evgeny A. Panfertsev, MD, PhD, senior researcher department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: panfera62@mail.ru

Sergey F. Biketov, PhD (Biology), leading researcher department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: biketov@mail.ru

**НОВОСТИ НАУКИ****Антибиотикоустойчивость *Mycobacterium tuberculosis* на Ближнем востоке**

Опубликовано первое обзорное исследование в регионе Ближнего Востока с целью определения уровней устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам первой линии как среди новых, так и ранее пролеченных случаев.

За период с 1981 по 2014 гг. было собрано в общей сложности 480 статей об уровне устойчивости к антибиотикам *M. tuberculosis* в разных странах ближневосточного региона. Около 63 соответствующих статей были отобраны с применением критериев включения и исключения.

С помощью метаанализа были определены уровни моно-лекарственной устойчивости, любой лекарственной устойчивости и множественной лекарственной устойчивости (МЛУ-ТБ) как у новых, так и у ранее леченных больных туберкулезом, живущих в разных частях Ближнего Востока. Были также проанализированы другие аспекты, связанные с пациентами, резистентностью к противомикробным препаратам и методами, используемыми для оценки уровня резистентности.

Показано, что по сравнению со средним мировым показателем, показатель распространенности лекарственно-устойчивого ТБ, особенно МЛУ-ТБ, может увеличиваться на Ближнем Востоке. Следовательно, для предотвращения распространения изолятов, устойчивых к лекарствам, необходимо выявление первичной устойчивости к противотуберкулезным препаратам с использованием новых методов быстрой диагностики.

Khademi F. et al.

*Middle East Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance: A Systematic Review and Meta-Analysis. Infection, Epidemiology and Medicine*. 2017;3(1):25-35.

# Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза

В.И.Дятлова

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

Бруцеллез остается актуальной проблемой для отечественной ветеринарии и медицины. Это заболевание наносит не только экономический ущерб, обусловленный нарушением репродуктивных функций или гибелью сельскохозяйственных животных, но и приводит к инвалидизации больных людей. Одной из причин распространения бруцеллеза среди животных и заражения от них человека является отсутствие эффективной, безопасной вакцины, обеспечивающей длительную защиту от инфекции. В последние годы в связи с развитием генной инженерии в практику внедряются новые методы производства вакцин. Современные направления в разработке противобруцеллезных вакцин включают создание живых генномодифицированных и векторных вакцин, а также бесклеточных субъединичных и ДНК-вакцин на основе иммунодоминантных антигенов бруцелл. В статье обобщены последние достижения в разработке противобруцеллезных вакцин и оценены перспективы их широкого применения.

**Ключевые слова:** *Brucella, бруцеллез, антигены, векторные вакцины, ДНК-вакцины, генетически модифицированные вакцины, живые вакцины, субъединичные вакцины*

**Для цитирования:** Дятлова В.И. Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2019; 4(4): 29–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41

## Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines

V.I.Dyatlova

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

Brucellosis is still a key issue for the national veterinary medicine and public health systems. The disease is responsible not only for economic loss due to reproductive disorders or death of farm animals, but also for disability of sick people. One of the reasons for the spread of brucellosis among animals and associated human infection is the lack of an effective safe vaccine providing long-term protection against the infection. In last years, new vaccine production methods have been put into practice owing to progressing genetic engineering. Current trends in the development of anti-brucellosis vaccines rely on designing live genetically modified and vector-based vaccines, as well as acellular subunit and DNA vaccines based on immunodominant brucella antigens. The article covers the latest advances in designing anti-brucellosis vaccines, and prospects for their wide application.

**Keywords:** *Brucella, brucellosis, antigens, vector vaccines, DNA vaccines, genetically modified vaccines, live vaccines, and subunit vaccines*

**For citation:** Dyatlova V.I. Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines. Bacteriology. 2019; 4(4): 29–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41

**Б**руцеллез является зоонозным заболеванием, которое распространено более чем в 170 странах мира, в том числе и в России. Оно поражает около 60 видов диких животных, создавая резервуары в природе, практически всех домашних животных, нанося значительный экономический ущерб в сельском хозяйстве, а также приводит к хронизации инфекции и инвалидизации зараженных им людей.

Неблагополучная эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации по бруцеллезу людей сохраняется в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах [1]. Одной из причин распространения бруцеллеза среди животных и заражения от них человека является отсутствие эффективной, безопасной вакцины, обеспечивающей длительную защиту от инфекции. Особенно востре-

### Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: varya\_dyatlova@mail.ru

Статья поступила 06.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, researcher, department of immunobiology of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: varya\_dyatlova@mail.ru

The article was received 06.11.2019, accepted for publication 20.12.2019

бована в настоящее время вакцина против бруцеллеза для иммунизации людей. За рубежом до сих пор не существует соответствующей лицензированной вакцины.

### Живые противобруцеллезные вакцины

Применяемая в нашей стране живая аттенуированная вакцина, приготовляемая из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 VA, имеет обширный список противопоказаний и побочных эффектов – от постпрививочных местных и общих реакций организма вплоть до развития бруцеллеза. Эта вакцина применяется только у людей старше 18 лет и не ранее чем за месяц до начала работы, связанной с риском заражения *Brucella*. Вакцинацию *B. abortus* 19 VA запрещено проводить беременным и кормящим женщинам, при ряде заболеваний, после лечения некоторыми лекарственными препаратами, а также лицам, переболевшим ранее бруцеллезом или имеющим положительные серологические реакции на бруцеллез. В связи с описанными недостатками применение данной вакцины ограничено использованием ее у животных, ветеринаров, зоотехников, работников мясоперерабатывающих предприятий и бактериологических лабораторий при риске заражения бруцеллезом козье-овечьего вида, вызываемого *B. melitensis*. Это обусловлено тяжелым течением данной формы заболевания [2].

Наиболее распространенные в мире живые вакцины против бруцеллеза для животных (*B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev1) запрещены к применению у людей, так как они могут снова приобрести вирулентность и вызывать заболевание. Вакцинный штамм *B. abortus* S19 применяют для крупного рогатого скота до 8-месячного возраста, так как у взрослых животных его использование может привести к развитию хронической инфекции, сопровождающейся бесплодием, абортными, а также выделением возбудителя с молоком. Кроме того, контакт человека с данными препаратами во время проведения вакцинации животных также представляет угрозу его заражения [3, 4]. Одним из недостатков вакцин *B. abortus* RB51 и *B. melitensis* Rev1 является их антибиотикорезистентность к рифампицину и стрептомицину, которые являются препаратами выбора при лечении бруцеллеза. Вместе с тем применение данных вакцин создает риск передачи генов устойчивости к данным антибиотикам дикому штамму бруцелл [5]. При введении в организм вакцинных штаммов *Brucella* с гладким типом колоний (в S-форме), таких как *B. abortus* S19 и *B. melitensis* Rev1, формируется антительный ответ на О-полисахарид (ОПС) липополисахарида (ЛПС) их клеточных стенок. Следовательно, серодиагностика бруцеллеза, основанная на выявлении диагностического титра анти-ЛПС антител в дальнейшем будет неинформативна. Эти вакцины имеют отрицательный показатель способности к дифференцированию вакцинированных и инфицированных животных (differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA)). Данный показатель рассматривается современными исследователями в качестве важного критерия пригодности разрабатываемых вакцин [5].

Кроме отсутствия стимулирования продукции антител, затрудняющих серодиагностику при выявлении зараженных животных, по мнению J.Ко, E.M.Dorneles и других авторов, «идеальная» вакцина против бруцеллеза должна содержать

живые бактерии, способные генерировать мощный Th1-клеточный ответ в организме хозяина; вызывать длительный протективный эффект после введения единичной дозы вакцины без побочных эффектов; содержать аттенуированные штаммы *Brucella*, не вызывающие заболевание или персистирующую инфекцию у животных; быть стабильной и не реверсировать в вирулентную форму ни *in vivo*, ни *in vitro*; не приводить к сероконверсии при ревакцинации; быть безопасной для людей при случайном заражении при введении вакцины животным; доступной для массового применения, простой в производстве и использовании [6, 7].

Несмотря на все недостатки живых противобруцеллезных вакцин, такие их преимущества, как возможность обеспечения длительной протекции организма против инфекции в сочетании с развитием полноценного иммунного ответа, позволяют рассматривать их в качестве кандидатов для будущих вакцин.

### Генетически модифицированные живые вакцины против бруцеллеза

Проблемы остаточной вирулентности и затруднения серодиагностики, связанные с применением живых вакцин, могут быть решены с помощью генно-инженерных методов. В последние годы было разработано и протестировано на модельных животных множество вариантов вакцин на основе генномодифицированных мутантных штаммов бруцелл (таблица).

Все известные на сегодняшний день 12 видов бруцелл имеют близкое генетическое родство (монофилетический род), демонстрируя сходство от 98 до 99% в большинстве кодирующих последовательностей [8]. Однако, несмотря на высокую генетическую гомологию, виды существенно различаются по фенотипическим характеристикам, специфичности хозяина и патогенности [9, 10]. Заболевание у человека вызывают преимущественно *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* и редко *B. canis*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*. Кроме того, относительно недавно из раневого отделяемого грудного импланта у человека был выделен вид *B. inopinata*, который может вызывать бруцеллез [11]. Все виды *Brucella*, кроме *B. canis* и *B. ovis*, имеют гладкий (S) фенотип бактерий. Мутации в генах бруцелл (*per*, *pgm*, *manB*, *wboA*, *wbkA* и др.), участвующие в биосинтезе ОПС ЛПС, могут приводить к формированию шероховатого типа колоний (R-фенотипа) и ослаблению их вирулентности. Усилия исследователей при создании вакцин направлены прежде всего на создание аттенуированных штаммов *Brucella* в R-форме. Многие разработанные вакцины R-типа являются спонтанными мутантами, отобранными после повторного пассажа на среде, содержащей антибиотики. Однако в настоящее время их получают преимущественно с помощью методов генной инженерии [12].

Геном вакцинного штамма *B. abortus* S19 включает 720 нуклеотидных делеций в *egu*-опероне, что обуславливает аттенуацию штамма, но сохранение синтеза ОПС и, следовательно, возникновение связанных с ним побочных эффектов, таких как аборты у животных, вирулентность для людей и затруднение диагностики из-за персистенции анти-ОПС антител [13]. В работе Z.Wang удаление гена *wboA* в геноме *B. abortus* S19 привело к образованию

Таблица. Сравнение противобруцеллезных вакцин	
Тип вакцины	Свойства вакцин
Живые аттенуированные вакцины	<i>B. abortus</i> RB51: шероховатый фенотип (не индуцирует синтез антител к ЛПС и дифференцирует инфицированных от вакцинированных животных (DIVA)), стабильный, менее вирулентный, чем S19, низкий уровень абортот, различный уровень защиты, вирулентный для человека, резистентный к рифампицину. <i>B. abortus</i> S19: гладкий фенотип (интерференция с диагностическим тестом), остаточная вирулентность, вызывает прерывание беременности, снижение продукции молока, высокий уровень защиты, вирулентный для человека. <i>B. melitensis</i> Rev1: гладкий фенотип (интерференция с диагностическим тестом), остаточная вирулентность, резистентный к стрептомицину
Генетически модифицированные живые вакцины <i>B. abortus</i>	Защита, аналогичная классическим живым аттенуированным вакцинам. $\Delta$ norD или $\Delta$ znuA <i>B. abortus</i> : достаточная аттенуация, повышенный Т-клеточный ответ. $\Delta$ pgm <i>B. abortus</i> : шероховатый фенотип, DIVA, иммунитет Th1-типа, подобный S19. $\Delta$ GntR <i>B. abortus</i> : достаточная аттенуация, высокий уровень защиты. $\Delta$ znuA + чистый <i>B. abortus</i> : сильное ослабление, требуется введение двух доз. $\Delta$ vjbR штамма S19: высокий уровень защиты, меньшая воспалительная реакция. $\Delta$ cydC или $\Delta$ cydD <i>B. abortus</i> : иммунитет типа Th1, высокая эффективность защиты по сравнению со штаммом RB51. $\Delta$ Mfr или $\Delta$ OMP19 <i>B. abortus</i> : аналогичный уровень защиты по сравнению с S19 и RB51. $\Delta$ BAB_RS22915 <i>B. abortus</i> : минимальное патологическое повреждение, эффективный иммунный ответ. $\Delta$ htrA + cydL <i>B. abortus</i> : ослабление штамма 2308. $\Delta$ wbkC <i>B. abortus</i> : шероховатый мутант, более ослабленный, слабая защита по сравнению с S19
Векторные вакцины	Живые, репликативные в клетке-хозяине, индуцируют клеточный опосредованный иммунитет, хорошее представление иммунной системе, варьирует уровень защиты. <i>Yersinia enterocolitica</i> экспрессирует BFR, P39. <i>Ochrobactrum anthropic</i> – SOD. <i>Lactococcus lactis</i> – SOD, L7/L12. <i>Salmonella typhimurium</i> – 31 кДа, BCSP31, SOD, OMP3b, OMP19, L7/L12, BLS, prpA. <i>Vaccinia viruses</i> – g L7/L12, OMP18 и GroEL. <i>Semliki Forest virus</i> – IF3 и Sod C. <i>Influenza viruses</i> – L7/L12 и OMP16. <i>Adenovirus</i> – p39, BLS. <i>B. abortus</i> RB51 оверэкспрессия – SOD, wboA, L7/L12. <i>Escherichia coli</i> – $\beta$ -галактозидаза. <i>Mycobacterium bovis</i> – 65кДа-белок теплового шока
Субъединичные вакцины	Авирулентная, DIVA, пригодная для использования для человека, низкий уровень защиты, необходимы адьюванты, требует многократного введения, высокая стоимость. OMP2b, OMP3b, OMP10, OMP16, OMP19, OMP25, OMP28 (BP26), OMP31, Cu/Zn SOD, P39, DnaK, SurA, BCSP31, GroES, L7/L12, P39, AsnC, rE2o, rCysK, rOMP19 + rP39, химерный белок из OMP19 и p39, OMP25-BLS, OMP25 с адьювантом Фрейнда, AspC, Dps, InpB и Ndk
ДНК-вакцины	Безопасная, индуцирующая как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, низкий уровень защиты по сравнению с белковыми вакцинами, отсутствие остаточной вирулентности, требует первичной стимуляции. ДНК-вакцины, кодирующие BAB1_0263, BAB1_0278, BAB1_0278, BAB1_0273, BAB1_0278 + SOD C, 21 эпитоп OPC GI-3 и SOD, слитый белок SOD и IL-2, SOD, BCSP31 и L7/L12 с белками <i>M. bovis</i> (Ag85B, MPT64, MPT83), L7/L12 + OMP16, Bp26 + TF, P39, groEL
Другие вакцины	Непатогенные альфапротеобактерии. Повышение IgG, IgA, защита от <i>B. abortus</i> 2308. Инактивированные вакцины. Gl24-лизат <i>B. abortus</i> – защита коз от <i>B. abortus</i> 544. Хитозановые наночастицы с антигенами OMP31, OMP25-BLS-rHSP60, BLS-OMP31. Повышение IgG1, IgG2a, IgM, ИФН- $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-17, защита от <i>B. melitensis</i> 16M. Синтетические пептиды. Пептид SOD (GGAPGEKDGKIVPAG). Защита от <i>B. abortus</i> . Везикулы внешней мембраны <i>B. melitensis</i> . Повышение IgG1, IgG2a, цитокинов Th1, Th2, Th17, защита от <i>B. melitensis</i> 16M

Р-фенотипа колоний, а также обеспечило защиту от бруцеллеза у животных после заражения *B. abortus* 2308, не вызывая абортот у беременных овец [14]. В другом исследовании делеция гена *pgm*, отвечающего за синтез фосфоглюкомутазы, в вирулентном штамме *B. abortus* S2308 привела к формированию у него шероховатого типа колоний, авирулентности для мышей, стимуляции клеточного иммунного ответа с уровнем защиты от бруцеллеза, сравнимым с *B. abortus* S19, при этом не выявлялись специфические антитела [15–19].

Кроме того, протективным потенциалом обладают мутантные вакцины, дефектные по генам, отвечающим за синтез компонентов метаболических путей у бруцелл. Среди них гены *purL*, *purD* и *purE* (белки пути биосинтеза пурина), *bacA* (транспортер жирной кислоты липида А), *hemH* (феррохелатаза), *pgk* (фосфоглицераткиназа), оперон *virB* (система секреции IV типа), *znuA* (транспортер цинка), *BAB1\_0542* (ABC-транспортер АТФазы) и другие [20–23]. Например, использование в разных работах штамма *B. abortus* 2308, в геноме которого были удалены гены *znuA*, *pgk* или *BAB1\_0542*, в качестве противобруцеллезной вакцины обеспечило защиту мышей от заражения вирулентным штаммом бруцелл, сравнимую с *B. abortus* S19 и RB51 [23, 24]. А од-

новременная делеция двух генов (*htrA* и *cydL*) у *B. abortus* 2308 привела к снижению его патогенного действия для коров [25].

Одним из новых подходов в разработке вакцин является внесение дополнительных генов в геном вакцинного штамма *B. abortus* RB51. Так, в работе R.Vemularalli вставка гена, кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу (*sodC*), в *B. abortus* RB51 привела к росту экспрессии данного белка у бруцелл и повышению защитной эффективности данной вакцины против заражения *B. suis* [26]. Кроме того, вакцинирование мышей штаммом *B. abortus* RB51, синтезирующим гетерологичные антигены ( $\beta$ -галактозидазы *Escherichia coli*, 65 кДа белка теплового шока, ESAT-6 и Ag85A *Mycobacterium tuberculosis*), индуцировало повышение продукции IgG2a и интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), что свидетельствовало об активации клеточного иммунного ответа и возможности создания на основе *B. abortus* RB51 мультивакцины против нескольких возбудителей заболеваний [27].

Снижение риска возникновения остаточной вирулентности живых вакцин может обеспечить применение ослабленных вирусов или бактерий в качестве векторов, экспрессирующих протективные антигены бруцелл непосредственно в организме человека или животных.



### Векторные вакцины против бруцеллеза

Применение векторных рекомбинантных вакцин позволяет имитировать естественное инфицирование, модулируя клеточный и гуморальный иммунный ответ у хозяина на растущее число продуцируемых векторным штаммом чужеродных антигенов. В последние годы было разработано множество подобных вакцин как на основе бактерий (*Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi*, *Lactococcus lactis*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*), так и вирусов (*Semliki Forest virus*, *Vaccinia virus*, *Influenza virus*) [28–34].

В работах нескольких авторов была продемонстрирована эффективность использования в качестве векторных вакцин аттенуированных штаммов сальмонелл, продуцирующих различные белки бруцелл (31 кДа, BCSP31, SOD, OMP3b, OMP19, L7/L12, BLS, prp A и другие). Так, в работе С.Неравадуге et al. пероральное применение вакцины на основе мутантного штамма *Salmonella typhimurium*, экспрессирующего SOD и OMP19, совместно с антацидом бикарбонатом натрия индуцировало мукозный и системный иммунный ответ у BALB/с-мышей, а также способствовало формированию протективного иммунитета при заражении их вирулентным штаммом *B. abortus* 544 [29].

Перспективным направлением в разработке векторных вакцин является использование лактобактерий. Они могут применяться перорально, не требуют тщательной очистки, доставляют гетерологичные белки в глубокие слои слизистой оболочки пищеварительного тракта, избегая действия кислотной среды желудка и ферментов, и стимулируют как мукозный, так и системный иммунный ответ. Для этих целей в последние годы наиболее часто применяется *Lactococcus lactis*. После попадания в просвет кишечника рекомбинантные штаммы *L. lactis* проникают через М-клетки слизистой оболочки, размножаются в фагоцитирующих клетках и экспрессируют чужеродные антигены, активируя иммунную систему [35]. В большинстве экспрессионных систем *L. lactis* продукция белка стимулируется антибиотиком низином, используя низин-индуцибельную систему [32, 36]. D.S.Pontes et al. в 2003 г. показали, что рекомбинантный штамм *L. lactis*, продуцирующий бруцеллезный белок L7/L12 под контролем низинового промотора, при пероральном введении мышам BALB/с может индуцировать местный гуморальный иммунный ответ и способствовать значительному повышению уровня анти-L7/L12 IgA в кале [32]. А в 2012 г. D.Sáez et al., трансформировав *L. lactis* геном *sodC*, выявили, что перорально вакцинированные данным штаммом мыши оказались защищены от заражения вирулентным штаммом *B. abortus* 2308 [33].

Среди противобруцеллезных вакцин, созданных на основе мутантных вирусов, несущих гены иммунодоминантных антигенов бруцелл, наибольшую эффективность показали штаммы *Semliki Forest virus*, продуцирующие IF3, SOD, а также *Influenza virus* [31]. Так, вакцинация беременных коз и овец вирусом гриппа, экспрессирующим белки OMP16, OMP19, SOD или L7/L12, с адьювантом Montanide™ Gel 01 защитила 70% животных от бруцеллеза при заражении их вирулентным штаммом *B. melitensis* 16М [30, 34]. Использование *Vaccinia virus* в качестве векторной противобруцеллезной вакцины во многих случаях (например, при экспрессии белков OMP18, L7/L12) оказалось неоправданным.

Критическим свойством данного вируса является способность снижать ИФН- $\gamma$ -ответ у хозяина, который необходим для защиты от бруцеллеза, что также подтверждает его непригодность для целей вакцинации [28].

К векторным вакцинам можно отнести и мутантные штаммы бруцелл, непатогенные для человека или крупного рогатого скота, но синтезирующие факторы вирулентности. D.Moustafa et al. разработали три вакцинных штамма из *B. neotomae* (гладкий штамм, выделенный от пустынных мышей): *B. neotomae* SOD, *B. neotomae* Bp26 и *B. neotomae*, облученный гамма-лучами, не способный к репликации, но сохраняющий метаболическую активность. Штаммы вводили внутривентриально мышам BALB/с, которые были заражены *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16М и *B. suis* 1330. Лучшую защиту от инфекции обеспечил облученный штамм [37]. Основываясь на данных результатах, N.Dabral et al. сравнили эффективность *B. abortus* RB51 и облученного штамма *B. neotomae*, которыми были перорально вакцинированы мыши. В обеих группах мышей регистрировались повышенные уровни ИФН- $\gamma$  и фактора некроза опухоли ФНО- $\alpha$ . Заражение мышей как внутривентриально, так и интраназально *B. abortus* 2308 показало, что защита, обеспечиваемая облученным штаммом *B. neotomae*, выше, чем *B. abortus* RB51 [38]. Альтернативой живым вакцинам могут служить бесклеточные генно-инженерные субъединичные и ДНК-вакцины против бруцеллеза.

### Субъединичные вакцины против бруцеллеза

Одним из перспективных направлений в борьбе против бруцеллеза является разработка субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков *B. abortus*, обладающих достаточной иммуногенностью для формирования протективного иммунитета у человека и восприимчивых животных. Преимуществом использования данных препаратов, в частности для человека, являются их безопасность, высокая иммуногенность, отсутствие дополнительных балластных белков и нуклеиновых кислот, которые могли бы вызвать перекрестные реакции и нежелательные побочные эффекты при вакцинации, возможность комбинирования с белковыми вакцинами, направленными на защиту от других патогенов. К их недостаткам можно отнести необходимость многократного введения препаратов и использования адьювантов для формирования полноценного иммунного ответа, а также низкую протективность по сравнению живыми вакцинами и высокую стоимость.

Выбор оптимальных антигенов представляет собой краеугольный камень в разработке вакцин. В связи с преимущественно внутриклеточным расположением патогена и блокированием им механизмов фаголизосомального слияния и апоптоза поверхностные компоненты клетки и везикулы внешней мембраны являются практически уникальными структурами, взаимодействующими с иммунной системой хозяина. Многие грамотрицательные бактерии, в том числе бруцеллы, во время нормального роста спонтанно секретуют везикулы наружной мембраны (outer membrane vesicles (OMV)). Они обладают двухслойной мембраной и содержат липопротеины, белки наружной мембраны (outer membrane proteins (OMP)), ЛПС и некоторые периплазматические компоненты. OMV вовлечены во многие процессы, включая вы-

свобождение факторов вирулентности, таких как протеазы и токсины, передачу сигналов между бактериальными и эукариотическими клетками, перенос ДНК, антибактериальную активность, стимуляцию иммунной системы хозяина и облегчение выживания бактерий во время оболочечного стресса. Иммуномодуляторные свойства этих антигенов позволяют рассматривать их в качестве субъединичных вакцин против бруцеллеза [39, 40]. Протеомный анализ показал, что везикулы наружной мембраны *B. melitensis* 16M содержат белки OMP2b, OMP3b, OMP10, OMP16, OMP19, OMP25, OMP28 (BP26), OMP31, Cu/Zn SOD, P39, DnaK, SurA, BCSP31, GroES и другие [40].

Высокой иммуногенностью обладают бруцеллезные OMP. В исследованиях К.А. Pasquevich перорально или парентерально вводимые мышам рекомбинантные липопротеины OMP16 и OMP19 (как с липидным участком, так и без него) индуцировали одинаково высокие уровни защиты против заражения *B. abortus*, причем без применения адьювантов. Адьювантность данных белков объясняется их способностью активировать дендритные клетки *in vivo*, дендритные клетки и макрофаги *in vitro*, стимулировать как Th1-, так и Th17-иммунные ответы против бруцелл. Пероральное введение OMP19, полученного в растительной экспрессионной системе *Nicotiana benthamiana*, стимулировало мукозный и системный иммунный ответ у мышей без применения адьювантов [41, 42].

Белок пептидогликанового слоя OMP25 является важным фактором вирулентности бруцелл, участвующим в выживании микроорганизма. Делеции гена *omp25* у *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. ovis* приводили к их аттенуации для мышей. Внутрикожная иммунизация мышей рекомбинантным белком OMP25 обеспечила защиту от заражения *B. abortus* 544, сравнимую с вакцинным штаммом *B. abortus* S19 [43].

OMP31, который на 34% гомологичен с OMP25, присутствует у всех видов *Brucella*, за исключением *B. abortus*. Среди белков наружной мембраны бруцелл представители семейства OMP25/OMP31 проявляют сильную иммуногенность, стимулируя как клеточный, так и гуморальный иммунитет. В последних исследованиях был обнаружен высокий уровень специфических антител против рекомбинантного OMP31 у большого процента обследованных собак, инфицированных *B. canis*. Таким образом, OMP31 может быть кандидатом для субъединичной вакцины против *B. canis* [44]. Также рекомбинантный белок OMP31 в сочетании с гидроксидом алюминия или неполным адьювантом Фрейна индуцировал значительные уровни защиты от *B. melitensis* в мышинной модели [45, 46]. Слитый белок 3E-IL2, содержащий 27-аминокислотный эпитоп OMP31 и интерлейкин-2 (IL-2), оказал более выраженный протективный эффект против *B. melitensis* M16 у мышей по сравнению с химерным антигеном OMP31-IL2, включающим целую OMP31 [47].

OMP28, также известный как BP26, обнаружен в периплазматическом пространстве бруцелл. Он высококонсервативен среди *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* и *B. neotomae*. OMP28 способен вызывать как гуморальные, так и клеточные реакции в организме хозяина, причем первые, как правило, преобладают. Использование сочетания рекомбинантного rOMP28 с адьювантом CpG (синтетическим олигодезоксинуклеотидом, содержащим CpG-мотив) в качестве субъединичной вакцины позволило переключить

тип иммунного ответа на Th1-ответ и индуцировать синтез IgG2a, T-клеточную пролиферацию и повышение экспрессии цитокинов первого типа (ИФН- $\gamma$ , IL-2, IL-12, ФНО- $\beta$ ), а при заражении мышей, вакцинированных вирулентным штаммом *B. abortus* 544, получить уровень протекции выше по сравнению с нативным антигеном OMP28, хотя и ниже, чем при применении вакцинного штамма *B. abortus* S19 [48].

Периплазматическая Cu/Zn-супероксиддисмутаза (SOD) является ключевым элементом защиты патогена от респираторного взрыва в фагоцитах хозяина. Этот белок (18,5–20 кДа) экспрессируется во всех видах бруцелл и оказывает выраженный протективный эффект при использовании его в качестве вакцины против бруцеллеза в мышинной модели. В работе Н. Singha введение мышам эшерихиосом, содержащих рекомбинантные SOD и провоспалительный цитокин IL-18, оказало выраженный протективный эффект при последующем заражении их *B. abortus* 544 [49].

Применение в работе А. Al-Mariri в качестве вакцины от бруцеллеза у мышей периплазматического белка P39 с адьювантом CpG обеспечило максимальную защиту, сравнимую с *B. abortus* S19, на 4-й неделе после заражения, однако к 8-й неделе этот эффект практически исчез [50].

Очищенные рекомбинантные цитозольные белки SurA и DnaK, вводимые мышам, индуцировали одинаковые невысокие уровни защиты от *B. abortus* по сравнению с контрольной живой вакциной. Иммунизация двумя данными белками не показала синергетического эффекта по сравнению с вакцинацией только одним антигеном [51].

Протективной активностью обладают и некоторые цитоплазматические белки: белки открытой рамки считывания, кодируемой геномным островком GI-3 (29 белков, включая BAV1-0260 (FlgJ), BAV2-0122 (FliN), BAV1-0263 и BAV1-0278 и др.), люмазин синтетаза (BLS), рибосомный белок L7/L12, цитоплазматический шаперон trigger factor (TF) и др. [52].

L7/L12, 12кДа-белок 50S-субъединицы рибосом бруцелл, обладает высокой иммуногенностью и способен оказывать защитный эффект. В работе D.P. Isore рекомбинантный L7/L12, а также ДНК-вакцину, содержащую ген данного белка, и *B. abortus* S19 вводили внутривентриально мышам. Через 30 дней после заражения их *B. abortus* 544 были выявлены повышенные уровни пролиферации лимфоцитов и концентрации ИФН- $\gamma$ , а также сниженная обсемененность селезенки у животных, иммунизированных бесклеточными вакцинами, по сравнению с живой вакциной [53].

Y. Hisham и Y. Ashhab с помощью методов биоинформатики и стратегии обратной вакцинологии анализировали 1939 белков из 90 протеомов трех видов бруцелл (*B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*). В результате сравнения антигенности белков, оценки плотности их B-клеточных эпитопов, а также эпитопов MHC-I и MHC-II был получен окончательный список из 34 потенциальных протективных антигенов для целей вакцинопрофилактики. Большинство из выявленных белков оказались связаны с такими биологическими процессами, как трансмембранный транспорт, сборка мембран, бактериальная адгезия, инвазия, адаптация к внутриклеточной среде макрофагов с дефицитом питательных веществ [54].

Тем не менее, как показывают эксперименты, моновалентная вакцина, основанная на одном антигене, не способна вызвать значительный протективный иммунитет. Более

эффективным для целей вакцинопрофилактики может оказаться комбинация из нескольких белков, экспрессирующихся в разные фазы жизненного цикла бактерий. Перспективным направлением усовершенствования субъединичных вакцин является создание «коктейлей» из иммунодоминантных эпитопов наиболее иммуногенных антигенов бруцелл. В работе M.Golshani et al. применение антигенного коктейля из трех рекомбинантных белков бруцелл (rL7/L12 + rTOmp31 + rSOmp2b) в сочетании с одним из двух вариантов адъювантов (CpG ODN 1826 + Montanide ISA 70VG или Poly I:C) индуцировало сильный иммунный ответ с преобладанием титра IgG2a, Th1-иммунного ответа и уровень защиты от бруцеллеза, сравнимый с живыми вакцинами [55]. В исследовании G.Taderalli внутрибрюшинная иммунизация мышей коктейлем из рекомбинантных белков rOMP19 и rP39 с неполным адъювантом Фрейнда способствовала формированию защитного иммунитета против *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 16M. А применение химерной молекулы rOP, содержащей данные антигены, индуцировало Т-клеточно-опосредованную иммунную защиту у мышей даже в отсутствие дополнительных стимуляторов за счет адъювантности OMP19 [56]. Использование смеси из нескольких рекомбинантных белков *B. abortus* (AspC, Dps, InpB и Ndk) в качестве субъединичной вакцины индуцировало высокий титр IgG2a и обеспечивало эффективность защиты от бруцеллеза, аналогичную эффективности штамма *B. abortus* RB51 [57]. В работе S.Paul был показан потенциал слитого рекомбинантного белка rL7/L12-Omp25 в качестве вакцины против бруцеллеза. При введении его внутрибрюшинно мышам он не только вызвал более выраженные, чем при применении вакцинного штамма *B. abortus* S19, клеточно-опосредованные и гуморальные иммунные реакции в их организме, но и защитил животных при заражении *B. abortus* 544 [58]. Z.Sadeghi et al. с помощью инструментов иммуноинформатики вычислили B-, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточные эпитопы трех белков *Brucella* (FliC, 7 $\alpha$ -HSDH, BhuA) и создали из них 2 мультиэпитопные вакцины (poly B и poly T). Иммунизация мышей данными вакцинами с адъювантом poly I:C обеспечила защиту мышей от *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 16M, сравнимую с эффектом от *B. abortus* RB51 и *B. melitensis* Rev1 [59].

Во многих исследованиях были продемонстрированы обнадеживающие результаты применения субъединичных вакцин против бруцеллеза. Однако большинство из них были выполнены на мышинных моделях, а иммунный ответ, наблюдаемый у мышей, может не соответствовать уровню защиты, достигаемому у естественных хозяев после вакцинации. Кроме того, создание комбинации из антигенов, способной индуцировать сильный иммунный ответ, соответствующий естественной инфекции, является сложной и комплексной задачей. Необходимость многократного введения таких препаратов и использования адъювантов значительно повышает стоимость вакцинации, а также ограничивает области ее применения.

### ДНК-вакцины против бруцеллеза

Кроме субъединичных противобруцеллезных вакцин, в настоящее время активно разрабатываются ДНК-вакцины. Они дают возможность получить пролонгированную экс-

прессию антигенов, вызывая как клеточные, так и гуморальные реакции в организме. ДНК-вакцины стабильны, не требуют замораживания, безопасны и могут применяться для людей [4].

В последние годы множество исследований было посвящено разработке противобруцеллезных ДНК-вакцин. Среди них – ДНК-вакцины, кодирующие L7/L12, BLS, P39, OMP16 и BAV1\_0278, которые продемонстрировали способность обеспечивать защиту от *B. abortus* у мышей [60]. Кроме того, ДНК-вакцина, несущая ген SOD, индуцировала уровень защиты, соответствующий применению *B. abortus* RB51 [61]. Использование в качестве вакцины плазмидной ДНК, содержащей гены BAV1\_0263 и бактериоферритин, не обеспечило защиту от вирулентного *B. abortus* у мышей [62].

Считается, что ДНК-вакцины вызывают менее мощные иммунные реакции, чем белковые вакцины [4]. Однако, например, ДНК-вакцина, экспрессирующая OMP31, вызывала такой же уровень защиты, как рекомбинантный белок rOMP31с неполным адъювантом Фрейнда против *B. melitensis* и *B. ovis*, а вакцина, продуцирующая BSL, оказалась более эффективной, чем аналогичный рекомбинантный белок, против заражения *B. abortus* [46, 63].

Разрабатываемые противобруцеллезные ДНК-вакцины уступают по уровню защиты коммерческим живым аттенуированным вакцинам. Применение различных стратегии повышения эффективности ДНК-вакцин может обеспечить возможность их широкого применения, в том числе для людей. Одна из стратегий улучшения ДНК-вакцин против бруцеллеза заключается в изменении экспрессии антигена путем изменения генетической конструкции. Например, в одной из работ замена обычно используемого промотора CMV на промотор MHC I крупного рогатого скота (p6) существенно снизила защитную эффективность ДНК-вакцины, экспрессирующей L7/L12 [64].

С другой стороны, клеточное расположение экспрессируемого белка также может быть изменено путем включения простых целевых последовательностей или сигналов секреции. Например, сигнальная последовательность активатора плазминогена в тканях человека использовалась для выделения бруцеллезного белка GroEL из клеток, трансфицированных продуцирующей его ДНК-вакциной. Однако эта стратегия индуцировала более низкие уровни антител у иммунизированных мышей, чем у несекретированных GroEL [65]. Остается неясным, является ли индукция секреции бруцеллезных белков подходящим методом для повышения эффективности ДНК-вакцин. Альтернативная стратегия, при которой внутриклеточный целевой сигнал, такой как убиквитин, сливается с антигеном бруцеллы, может оказаться более эффективной [66].

Другой подход повышения эффективности ДНК-вакцин заключается в модуляции иммунного ответа путем коэкспрессии цитокинов. Их гены могут располагаться на отдельной плазмиде либо быть слиты генами бруцеллезных белков внутри одной ДНК-вакцины. Например, слияние генов белков SOD с IL-2 или IL-18 в одной ДНК-вакцине обеспечило сохранение цитокинового эффекта в локальной среде на антиген. Однако в обоих этих случаях включение цитокина не привело к повышению защитной эффективности по сравнению с ДНК-вакцинами, экспрессирующими только SOD [67, 68].

Применение комбинированных ДНК-вакцин может обеспечить более эффективную протекцию от инфекции. Например, ДНК-вакцины, кодирующие BCSP31, SOD и L7/L12, стимулировали более высокий цитотоксический ответ у мышей по сравнению с *B. abortus* S19 [54]. Аналогичным образом, двухвалентная ДНК-вакцина, кодирующая гены L7/L12 и OMP16, также оказалась более эффективной и способной вызывать сильный пролиферативный Т-клеточный ответ, индуцировать большое количество ИНФ- $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток [69, 70]. Кроме того, было показано, что ДНК-вакцина, содержащая шесть генов, кодирующих иммунодоминантные антигены *B. abortus* (BCSP31, SOD и L7/L12) и *Mycobacterium bovis* (Ag85B, MPT64 и MPT83), индуцирует защиту, сравнимую с *B. abortus* S19 и БЦЖ у крупного рогатого скота, что позволяет рассматривать ее в качестве перспективной вакцины против обоих заболеваний [71].

В большинстве случаев иммунизация ДНК-вакциной против бруцеллеза проводится внутримышечно. Однако этот способ требует большого количества ДНК и может создать трудности для исследований на более крупных моделях животных, таких как человек. Такие методы, как опосредованная частицами эпидермальная доставка и прямое введение ДНК-вакцин в селезенку, были протестированы на мышах против других инфекций и показали многообещающие результаты [72]. Существующая схема иммунизации ДНК-вакцинами в несколько этапов (prime-boost) показала свою эффективность при применении ее для профилактики разных инфекций. Она позволяет инициировать иммунный ответ на антиген прежде, чем рекомбинантные белки или вирусные векторы будут использованы в качестве дополнительного его усиления. Однако в работе J.Cassataro введение мышам рекомбинантного белка OMP31 незначительно усилило иммунный ответ на первично вводимую ДНК-вакцину, экспрессирующую данный антиген [73–76].

Несмотря на преимущества ДНК-вакцин для профилактики бруцеллеза, такие как безопасность, простота производства и применения, длительная персистенция иммуногена, стимуляция клеточного и гуморального иммунитета, у них есть ряд недостатков, в частности, вероятность атипичного процессинга белка, синтез антител к ДНК, риски воздействия на гены, контролирующие рост клеток, или передачи генов устойчивости к антибиотикам бактериям и другие.

#### Другие перспективные противобруцеллезные вакцины

Поскольку было доказано, что существует перекрестная реактивность между антигенами бруцелл и непатогенными альфа-протеобактериями (АПБ), то вакцинация с помощью АПБ может защитить животных от бруцеллезной инфекции. Исследовательской группой M.V.Delpino был проведен ряд экспериментов, в которых мышам подкожно иммунизировали термически убитыми *Ochrobactrum anthropi*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens*, а также *Brucella melitensis* H38 в качестве стандартного положительного контроля. Наиболее выраженный иммунный ответ после внутривенного введения *B. abortus* 2308 наблюдался у мышей, иммунизированных *O. anthropi*, *M. loti* и *B. melitensis* H38, по сравнению с вводимым цитозольным экстрактом бруцелл. Кроме того, пероральное введение живых *O. anthropi* и последующее заражение мышам *B. abortus*

2308 индуцировало повышенные уровни IgA в сыворотке в крови и кале, а также показателей активации клеточного иммунитета по сравнению с неиммунизированными животными (но меньшие, чем выявлены у мышам, вакцинированных инактивированным *B. abortus* 2308) [77].

Инактивированные противобруцеллезные вакцины, как правило, демонстрируют низкую протективную эффективность и при этом требуют применения адъювантов и введения нескольких ревакцинирующих (бустер) доз препарата. Однако в работе Won-Kyong Kim 2019 г. было показано, что использование клеток *B. abortus*, лизированных GI24 (фрагментом свиного миелоидного антимикробного пептида), для внутрикожной иммунизации коз стимулировало повышенные уровни IL-4, ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , анти-ЛПС антител по сравнению с контрольными животными и при последующем субконъюнктивальном заражении их вирулентным штаммом *B. abortus* 544 три из пяти коз оказались защищены от инфекции [78].

Одним из вариантов доставки антигенов в организм является применение наночастиц. M.Abkar et al. было показано, что пероральное введение мышам N-триметил-хитозановых наночастиц с OMP31 индуцирует Th1- и Th17-ответы и обеспечивает значительный уровень защиты от *B. melitensis* 16M через 4 недели после вакцинации [79]. Применение слитого белка OMP25-BLS, помещенного в хитозановую наночастицу, для иммунизации мышам выявило преобладание гуморального ответа на данный антиген в организме хозяина. При этом внесение дополнительно рекомбинантного бруцеллезного белка теплового шока rHSP60 способствовало переключению иммунного ответа на клеточный ответ [80]. Иммунизация слизистых оболочек (интраназально и субконъюнктивально) двумя полимерными антигенами (BLSOmp31-ChM в хитозановой микросфере и BLSOmp31-P407-Ch в терморезистивном и мукоадгезивном геле Poloxamer 407-Ch), содержащими слитый белок BLS-Omp31, стимулировала местный и системный иммунитет и обеспечила сниженный уровень бактериальной нагрузки в селезенке у овец при заражении *B. ovis* [81].

В качестве альтернативы существующим живым вакцинам разными авторами предпринимались попытки использовать синтетические пептиды эпитопов иммунодоминантных белков бруцелл. Например, L.B.Tabatabai и G.W.Pugh синтезировали 3 пептида белка Cu-Zn SOD *B. abortus*, один из которых, пептид 3 (GGAPGEKDGKIVPAG), продемонстрировал протективную активность при заражении вирулентным штаммом бруцелл. Однако в целом этот класс вакцин обладает относительно низкой степенью защиты от инфекции, что затрудняет их эффективное применение [82].

Везикулы внешней мембраны (OMV), секретируемые бруцеллами, содержат компоненты, ассоциированные с вирулентностью бактерий, и обладают иммуномодулирующими свойствами. Белки OMV могут проникать в эукариотические клетки путем эндоцитоза и индуцировать не только мембранные рецептор-зависимые пути, но и цитоплазматические рецепторы, такие как NOD (рецептор связывания нуклеотидов и олигомеризации), стимулируя иммунный ответ [6, 40]. В работе E.D.Avila-Calderón OMV два штамма *B. melitensis* (гладкий 16M и шероховатый мутант VTRM1) вводили внутримышечно мышам с последующим заражени-

ем их вирулентным штаммом *B. melitensis* 16M. При этом OMV из *B. melitensis* VTRM1 индуцировали существенно более высокие показатели экспрессии генов IL-12, ФНО- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  в дендритных клетках костного мозга, чем OMV из гладкого штамма *B. melitensis* 16M. Иммунизация мышей OMV как из гладкого, так из шероховатого штаммов обеспечило уровни защиты мышей от бруцеллеза, сравнимые с уровнями, полученными в группе мышей, вакцинированных живым штаммом *B. melitensis* Rev1 ( $p < 0,005$ ). Кроме того, у мышей, вакцинированных OMV из *B. melitensis* VTRM1, наблюдалось повышение уровня IgG2a в сыворотке крови, что свидетельствует о стимуляции клеточного иммунитета [39]. В настоящее время в нескольких странах мира (Куба, Норвегия, Новая Зеландия) уже доступна для массового применения вакцина, основанная на OMV, против *Neisseria meningitidis* серогруппы В. Следовательно, допустимо предположить, что подобная противобруцеллезная вакцина также может быть эффективной, в том числе для защиты людей от инфекции [6, 83].

### Заключение

Необходимость создания новых эффективных и безопасных противобруцеллезных вакцин в настоящее время стоит особенно остро. Естественные резервуары бруцеллеза в дикой природе являются постоянным источником инфицирования домашних животных, которые заражают человека. Кроме того, в связи с аэрогенным распространением и стойкостью бруцелл в окружающей среде существует риск использования их в качестве биологического оружия. Поздняя диагностика и малоэффективное лечение заболевания могут приводить к хронизации инфекции и инвалидизации пациентов [84].

Несмотря на значительные усилия, предпринимаемые учеными всего мира, до сих пор не существует международной лицензированной противобруцеллезной вакцины для человека. Идеальная противобруцеллезная вакцина для использования на людях должна быть безопасной, эффективной, обеспечивать долговременную защиту, не должна вызывать заболевание и выраженные местные или системные реакции и, желательнее, должна стимулировать формирование противоинфекционного иммунитета после ее однократного применения.

При разработке вакцины для людей необходимо учитывать ряд требований, необходимых для ее лицензирования. Эффективность такого препарата должна быть подтверждена по крайней мере на двух моделях животных. Испытания вакцины проводятся как на небольших (например, на мышах), так и на более крупных животных (предпочтительно на нечеловеческих приматах). Для лицензирования препарата также необходимо подтверждение его безопасности, иммуногенности и эффективности на людях. Хотя живые аттенуированные вакцины против бруцеллеза обладают потенциальными преимуществами с точки зрения иммуногенности и защитной эффективности, лицензирование такой вакцины для людей может оказаться затруднительным. Производство вакцин на основе живых бруцелл, как правило, является дорогостоящим в связи с необходимостью использования лабораторий с высоким уровнем защиты, постоянного контроля качества препаратов, соблюдения усло-

вий их хранения и транспортировки [4]. Субъединичные вакцины считаются безопасными для человека, однако для достижения высокого уровня защиты от бруцеллеза, как правило, необходимо создание комбинации из нескольких антигенов и адьюванта, а также многократное введение препарата. Кроме того, вакцина, основанная на очищенных белках, вероятно, потребует охлаждения, которое трудно соблюсти в некоторых районах мира, где распространен бруцеллез. В данном случае ДНК-вакцина будет обладать преимуществами, так как она безопасна, стабильна во внешней среде, может обеспечить экспрессию нескольких антигенов и их длительную персистенцию в организме, проста и недорога в производстве. Реализация различных стратегий улучшения качества противобруцеллезных ДНК-вакцин может помочь в разработке препаратов, пригодных для применения для людей.

### Литература

1. Лямкин ГИ, Пономаренко ДГ, Худолеев АА, Вилинская СВ, Зайцев АА, Куличенко АН. Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах – участниках Содружества Независимых Государств. Инфекционные болезни. Новости. Лечение. Обучение. 2016;1(14):68-74.
2. Профилактика бруцеллеза: Санитарно-эпидемиологические правила. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010, 27 с.
3. Охалкина ВЮ, Пяткова НВ, Павлов ДЛ, Суслопаров АА. Эпидемическая опасность бруцеллеза в современных условиях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(3):15-22.
4. Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans. Review. FEMS Microbiol Rev. 2010 May;34(3):379-94. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x
5. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. Review. J Vet Sci. 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
6. Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. Veterinary research. 2015;46(1):76.
7. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin Microbiol Rev. 2003 Jan;16(1):65-78. DOI: 10.1128/cmr.16.1.65-78.2003
8. El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. Int J Vet Sci Med. 2018 Mar 21;6(Suppl):S31-S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
9. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. Rev Sci Tech. 2013 Apr;32(1):149-62. DOI: 10.20506/rst.32.1.2189
10. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Review. Infect Genet Evol. 2009 Dec;9(6):1168-84. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001
11. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol. 2010 Apr; 60(Pt 4):801-8. DOI: 10.1099/ijs.0.011148-0
12. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system Review. Microb Cell Fact. 2006 Mar 23;5:13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
13. Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS Microbiol Lett. 1994 Sep 1;121(3):337-42. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07123.x
14. Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. Clin Vaccine Immunol. 2013 Feb;20(2):174-80. DOI: 10.1128/CVI.00573-12

15. Comerci DJ, Ugalde JE, Ugalde RA. Development of a New Live Rough Vaccine Against Bovine Brucellosis. In: Makkar H.P., Viljoen G.J. (eds). Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer, Dordrecht, 2005, p. 743-749.
16. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. Infect Immun. 2003 Jun;71(6):3261-71. DOI: 10.1128/iai.71.6.3261-3271.2003
17. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet Res. 2004 Jan-Feb;35(1):1-38. DOI: 10.1051/vetres:2003037
18. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6264-9. DOI: 10.1128/iai.71.11.6264-6269.2003
19. Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, Enright FM, et al. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. Am J Vet Res. 1996 May;57(5):677-83.
20. Alcantara RB, Read RD, Valderas MW, Brown TD, Roop RM 2<sup>nd</sup>. Intact purine biosynthesis pathways are required for wild-type virulence of *Brucella abortus* 2308 in the BALB/c mouse model. Infect Immun. 2004 Aug;72(8):4911-7. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4911-4917.2004
21. Almirón M, Martínez M, Sanjuan N, Ugalde RA. Ferrochelatase is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. Infect. Immun. 2001;69(10):6225-30.
22. Den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA, Tsolis RM. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5143-9. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5143-5149.2004
23. Trant CG, Lacerda TL, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, et al. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. Infect Immun. 2010 May;78(5):2283-91. DOI: 10.1128/IAI.01433-09
24. Zhang M, Han X, Liu H, Tian M, Ding C, Song J, et al. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. Vet Microbiol. 2013 Jun 28;164(3-4):322-9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.017
25. Edmonds M, Booth N, Hagius S, Walker J, Enright F, Roop RM 2<sup>nd</sup>, Elzer P. Attenuation and immunogenicity of a *Brucella abortus* htrA cycL double mutant in cattle. Vet Microbiol. 2000 Sep 15;76(1):81-90. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00225-x
26. Vemulapalli R, He Y, Cravero S, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. Infect Immun. 2000 Jun;68(6):3286-9. DOI: 10.1128/iai.68.6.3286-3289.2000
27. Vemulapalli R, He Y, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. Vet Microbiol. 2002 Dec 20;90(1-4):521-32. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00232-8
28. Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. Vet Microbiol. 2005 Aug 10;109(1-2):11-7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.011
29. Hewawaduge C, Senevirathne A, Lee JH. Enhancement of host infectivity, immunity, and protective efficacy by addition of sodium bicarbonate antacid to oral vaccine formulation of live attenuated *Salmonella* secreting *Brucella* antigens. Microb Pathog. 2020 Jan;138:103857. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103857
30. Mailybayeva A, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Sansyrbay A, Renukaradhya GJ, et al. Improved influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant sheep and goats. PLoS One. 2017 Oct 12; 12(10):e0186484. DOI: 10.1371/journal.pone.0186484
31. Oñate A, Donoso G, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Andrews E. An RNA vaccine based on recombinant *Semliki Forest* virus particles expressing the Cu, Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun. 2005 Jun;73(6):3294-300. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3294-3300.2005
32. Pontes DS, Dorella FA, Ribeiro LA, Miyoshi A, Le Loir Y, Gruss A, et al. Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. J Drug Target. 2003;11(8-10):489-93. DOI: 10.1080/10611860410001670035
33. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. Vaccine. 2012 Feb 8;30(7):1283-90. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.088
34. Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Syrymkyzy N, et al. Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle. Vaccine. 2014 Apr 11;32(18):2034-41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.058
35. Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N. *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. Avicenna J Med Biotechnol. 2017 Oct-Dec;9(4):163-168.
36. Azizpour M, Jafari P, Hoseini SD, Behrozikhah AM. Cloning and expression of *B. melitensis* bp26 Gene in *Lactococcus lactis* as a food grade vaccine. Avicenna J Med Biotechnol. 2019 Jul-Sep;11(3):264-267.
37. Moustafa D, Garg VK, Jain N, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. Vaccine. 2011 Jan 17;29(4):784-94. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.018
38. Dabral N, Moreno-Lafont M, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. PLoS One. 2014 Sep 16;9(9):e107180. DOI: 10.1371/journal.pone.0107180
39. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. Clin Dev Immunol. 2012;2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493
40. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. PLoS One. 2012;7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214
41. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS One. 2011 Jan 14;6(1):e16203. DOI: 10.1371/journal.pone.0016203
42. Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. J Immunol. 2010 May 1;184(9): 5200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.0902209
43. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. Mol Immunol. 2012 Jun;51(2):159-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.02.126

44. Clause M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c Mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2014 Dec;21(12):1689-94. DOI: 10.1128/CI.00527-14
45. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):8079-88.
46. Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, Ding J. The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Sci Rep.* 2019 Mar 5;9(1):3512. DOI: 10.1038/s41598-019-40084-w
47. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah AM. *In vivo* immunogenicity assessment and vaccine efficacy evaluation of a chimeric tandem repeat of epitopic region of OMP31 antigen fused to interleukin 2 (IL-2) against *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *BMC Vet Res.* 2019 Nov 8;15(1):402. DOI: 10.1186/s12917-019-2074-7
48. Kaushik P, Singh DK, Kumar SV, Tiwari AK, Shukla G, Dayal S, Chaudhuri P. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet Res Commun.* 2010 Feb;34(2):119-32. DOI: 10.1007/s11259-009-9337-x
49. Singha H, Mallick AI, Jana C, Fatima N, Owais M, Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2011 Jun 24;29(29-30):4720-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.088
50. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 2001 Aug;69(8):4816-22. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4816-4822.2001
51. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine.* 2007 Sep 17;25(37-38):6721-9.
52. Yang X, Walters N, Robison A, Trunkle T, Pascual DW. Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. *Vaccine.* 2007 Mar 8;25(12):2261-8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.004
53. Isore DP, Goswami TK, Chaudhury P, Mukhopadhyay SK, Ganguly S. Recombinant protein and DNA vaccine construct of *Brucella abortus* L7/L12 gene elicits immune response. *Asian Pac J Health Sci.* 2014;1(4):425-437.
54. Hisham Y, Ashhab Y. Identification of Cross-protective potential antigens against pathogenic *Brucella* spp. through combining pan-genome analysis with reverse vaccinology. *J Immunol Res.* 2018 Dec 9;2018:1474517. DOI: 10.1155/2018/1474517
55. Golshani M, Amani M, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Arsang A, Bouzari S. Comparison of the protective immunity elicited by a *Brucella* cocktail protein vaccine (rL7/L12 + rTOmp31 + rSOmp2b) in two different adjuvant formulations in BALB/c mice. *Mol Immunol.* 2018 Nov;103:306-311. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.10.002
56. Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19 + rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. *Mol Immunol.* 2016 Mar;71:34-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.01.001
57. Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Min W, et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2018 May 17;36(21):3027-3033. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.04.019
58. Paul S, Peddayalachagiri BV, Nagaraj S, Konduru B, Batra HV. Protective and therapeutic efficacy study of divalent fusion protein rL7/L12-Omp25 against *B. abortus* 544 in presence of IFN $\gamma$ . *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Oct;102(20):8895-8907. DOI: 10.1007/s00253-018-9314-9
59. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Bouzari S. Evaluation of immunogenicity of novel multi-epitope subunit vaccines in combination with poly I:C against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. *Int Immunopharmacol.* 2019 Oct;75:105829. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105829
60. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun.* 2001 Oct;69(10):6264-70.
61. Onate A, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2003 Sep;71(9):4857-61. DOI: 10.1128/iai.71.9.4857-4861.2003
62. Sisilema-Egas F, Céspedes S, Fernández P, Retamal-Díaz A, Sáez D, Oñate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine.* 2012 Nov 26;30(50):7286-91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.09.039
63. Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2002 May;70(5):2507-11. DOI: 10.1128/iai.70.5.2507-2511.2002
64. A Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine.* 1997;15:1851-7.
65. Leclercq S, Harms JS, Rosinha GMS, Azevedo V, Oliveira SC. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J Med Microbiol.* 2002 Jan;51(1):20-26. DOI: 10.1099/0022-1317-51-1-20
66. Brandsma JL, Shlyankevich M, Zelterman D, Su Y. Therapeutic vaccination of rabbits with a ubiquitin-fused papillomavirus E1, E2, E6 and E7 DNA vaccine. *Vaccine.* 2007 Aug 14;25(33):6158-63. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.06.012
67. Gonzalez-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. *Immunobiology.* 2006;211(1-2):65-74.
68. Singha H, Mallick AI, Jana C, Isore DP, Goswami TK, Srivastava SK, et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 2008 Aug-Sep;10(10-11):1089-96. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.05.007
69. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2006 May;74(5):2734-41. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2734-2741.2006
70. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol.* 2007 Jun;26(6):435-43. DOI: 10.1089/dna.2006.0552
71. Hu XD, Yu DH, Chen ST, Li SX, Cai H. A combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. *DNA Cell Biol.* 2009 Apr;28(4):191-9. DOI: 10.1089/dna.2008.0790
72. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, Jones S, Haynes JR, Dean HJ. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine.* 2006 May 22;24(21):4475-81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.012
73. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Jul;14(7):869-74. DOI: 10.1128/CI.00472-06
74. Leung L, Srivastava IK, Kan E, Legg H, Sun Y, Greer C, et al. Immunogenicity of HIV-1 Env and Gag in baboons using a DNA prime/protein boost regimen. *AIDS.* 2004 Apr 30;18(7):991-1001. DOI: 10.1097/00002030-200404300-00006

75. McConnell MJ, Hanna PC, Imperiale MJ. Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax. *Mol Ther*. 2007 Jan;15(1):203-10. DOI: 10.1038/sj.mt.6300034
76. Perkins SD, O'Brien LM, Phillpotts RJ. Boosting with an adenovirus-based vaccine improves protective efficacy against Venezuelan equine encephalitis virus following DNA vaccination. *Vaccine*. 2006 Apr 24;24(17):3440-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.020
77. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC. Partial protection against brucella infection in mice by immunization with nonpathogenic alphaproteobacteria. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Oct;14(10):1296-301. DOI: 10.1128/CVI.00459-06
78. Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR, Park BY, Hur J. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. *Can J Vet Res*. 2019 Jan;83(1):68-74.
79. Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Lotfi AS. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. *Int J Nanomedicine*. 2017 Dec 13;12:8769-8778. DOI: 10.2147/IJN.S149774
80. Yousefi S, Abbassi-Dalooi T, Sekhavati MH, Tahmoorespur M. Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25-BLS *Brucella* antigen. *Microb Pathog*. 2018 Feb;115:50-56. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.045
81. Díaz AG, Quinteros DA, Paolicchi FA, Rivero MA, Palma SD, Pardo RP, et al. Mucosal immunization with polymeric antigen BLS-Omp31 using alternative delivery systems against *Brucella ovis* in rams. *Vet Immunol Immunopathol*. 2019 Mar;209:70-77. DOI: 10.1016/j.vetimm.2019.02.005
82. Tabatabai LB, Pugh GW Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*. 1994;12:919-924.
83. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2009 Jun 24;27 Suppl 2:B3-12. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071
84. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Oct;63(19-20):2229-36. DOI: 10.1007/s00018-006-6311-4
8. El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int J Vet Sci Med*. 2018 Mar 21;6(Suppl):S31-S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
9. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev Sci Tech*. 2013 Apr;32(1):149-62. DOI: 10.20506/rst.32.1.2189
10. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Review. *Infect Genet Evol*. 2009 Dec; 9(6):1168-84. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001
11. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010 Apr;60(Pt 4):801-8. DOI: 10.1099/ijs.0.011148-0
12. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system Review. *Microb Cell Fact*. 2006 Mar 23;5:13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
13. Sangari FJ, García-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett*. 1994 Sep 1;121(3):337-42. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07123.x
14. Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 Feb;20(2):174-80. DOI: 10.1128/CVI.00573-12
15. Comerci DJ, Ugalde JE, Ugalde RA. Development of a New Live Rough Vaccine Against Bovine Brucellosis. In: Makkar H.P., Viljoen G.J. (eds). Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer, Dordrecht, 2005, p. 743-749.
16. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun*. 2003 Jun;71(6):3261-71. DOI: 10.1128/iai.71.6.3261-3271.2003
17. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res*. 2004 Jan-Feb;35(1):1-38. DOI: 10.1051/vetres:2003037
18. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun*. 2003 Nov;71(11):6264-9. DOI: 10.1128/iai.71.11.6264-6269.2003
19. Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, Enright FM, et al. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res*. 1996 May;57(5):677-83.
20. Alcantara RB, Read RD, Valderas MW, Brown TD, Roop RM 2<sup>nd</sup>. Intact purine biosynthesis pathways are required for wild-type virulence of *Brucella abortus* 2308 in the BALB/c mouse model. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4911-7. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4911-4917.2004
21. Almirón M, Martínez M, Sanjuan N, Ugalde RA. Ferrochelatase is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. *Infect Immun*. 2001;69(10):6225-30.
22. Den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA, Tsolis RM. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5143-9. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5143-5149.2004
23. Trant CG, Lacerda TL, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, et al. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. *Infect Immun*. 2010 May;78(5):2283-91. DOI: 10.1128/IAI.01433-09
24. Zhang M, Han X, Liu H, Tian M, Ding C, Song J, et al. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. *Vet Microbiol*. 2013 Jun 28;164(3-4):322-9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.017

## References

- Lyamkin GI, Ponomarenko DG, Khudoleev AA, Vilinskaya SV, Zaytsev AA, Kulichenko AN. The epidemiological situation of brucellosis in the Russian Federation and the member states of the Commonwealth of Independent States. *Infectious Diseases. News, Opinions, Training*. 2016;1(14):68-74. (In Russian).
- Prevention of brucellosis: Sanitary and epidemiological rules. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2010, 27 p. (In Russian).
- Okhapkina VYu, Pyatkova NV, Pavlov DL, Susloparov AA. Epidemic Risk of Brucellosis in Modern conditions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(3):15-22. (In Russian).
- Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans. Review. *FEMS Microbiol Rev*. 2010 May;34(3):379-94. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x
- Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. Review. *J Vet Sci*. 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
- Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary research*. 2015;46(1):76.
- Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):65-78. DOI: 10.1128/cmr.16.1.65-78.2003



25. Edmonds M, Booth N, Hagius S, Walker J, Enright F, Roop RM 2nd, Elzer P. Attenuation and immunogenicity of a *Brucella abortus* htrA cycL double mutant in cattle. *Vet Microbiol.* 2000 Sep 15;76(1):81-90. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00225-x
26. Vemulapalli R, He Y, Cravero S, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3286-9. DOI: 10.1128/iai.68.6.3286-3289.2000
27. Vemulapalli R, He Y, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet Microbiol.* 2002 Dec 20;90(1-4):521-32. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00232-8
28. Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet Microbiol.* 2005 Aug 10;109(1-2):11-7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.04.011
29. Hewawaduge C, Senevirathne A, Lee JH. Enhancement of host infectivity, immunity, and protective efficacy by addition of sodium bicarbonate antacid to oral vaccine formulation of live attenuated *Salmonella* secreting *Brucella* antigens. *Microb Pathog.* 2020 Jan;138:103857. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103857
30. Mailybayeva A, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Sansyzbay A, Renukaradhya GJ, et al. Improved influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant sheep and goats. *PLoS One.* 2017 Oct 12; 12(10):e0186484. DOI: 10.1371/journal.pone.0186484
31. Oñate A, Donoso G, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Andrews E. An RNA vaccine based on recombinant *Semliki Forest* virus particles expressing the Cu,Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2005 Jun;73(6):3294-300. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3294-3300.2005
32. Pontes DS, Dorella FA, Ribeiro LA, Miyoshi A, Le Loir Y, Gruss A, et al. Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. *J Drug Target.* 2003;11(8-10):489-93. DOI: 10.1080/10611860410001670035
33. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine.* 2012 Feb 8;30(7):1283-90. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.088
34. Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Syrymkyzy N, et al. Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle. *Vaccine.* 2014 Apr 11;32(18):2034-41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.058
35. Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N. *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2017 Oct-Dec;9(4):163-168.
36. Azizpour M, Jafari P, Hoseini SD, Behrozikhah AM. Cloning and expression of *B. melitensis* bp26 Gene in *Lactococcus lactis* as a food grade vaccine. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2019 Jul-Sep;11(3):264-267.
37. Moustafa D, Garg VK, Jain N, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. *Vaccine.* 2011 Jan 17;29(4):784-94. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.018
38. Dabral N, Moreno-Lafont M, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. *PLoS One.* 2014 Sep 16;9(9):e107180. DOI: 10.1371/journal.pone.0107180
39. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493
40. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012;7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214
41. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS One.* 2011 Jan 14;6(1):e16203. DOI: 10.1371/journal.pone.0016203
42. Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):5200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.0902209
43. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol.* 2012 Jun; 51(2):159-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.02.126
44. Clausse M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c Mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2014 Dec;21(12):1689-94. DOI: 10.1128/CVI.00527-14
45. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Veikovskiy CA, de la Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12): 8079-88.
46. Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, Ding J. The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Sci Rep.* 2019 Mar 5;9(1):3512. DOI: 10.1038/s41598-019-40084-w
47. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah AM. *In vivo* immunogenicity assessment and vaccine efficacy evaluation of a chimeric tandem repeat of epitopic region of OMP31 antigen fused to interleukin 2 (IL-2) against *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *BMC Vet Res.* 2019 Nov 8;15(1):402. DOI: 10.1186/s12917-019-2074-7
48. Kaushik P, Singh DK, Kumar SV, Tiwari AK, Shukla G, Dayal S, Chaudhuri P. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet Res Commun.* 2010 Feb;34(2):119-32. DOI: 10.1007/s11259-009-9337-x
49. Singha H, Mallick AI, Jana C, Fatima N, Owais M, Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine.* 2011 Jun 24;29(29-30):4720-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.088
50. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 2001 Aug;69(8):4816-22. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4816-4822.2001
51. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine.* 2007 Sep 17;25(37-38):6721-9.
52. Yang X, Walters N, Robison A, Trunkle T, Pascual DW. Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. *Vaccine.* 2007 Mar 8;25(12):2261-8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.004
53. Isore DP, Goswami TK, Chaudhury P, Mukhopadhyay SK, Ganguly S. Recombinant protein and DNA vaccine construct of *Brucella abortus* L7/L12 gene elicits immune response. *Asian Pac J Health Sci.* 2014;1(4):425-437.
54. Hisham Y, Ashhab Y. Identification of Cross-protective potential antigens against pathogenic *Brucella* spp. through combining pan-genome analysis with reverse

- vaccinology. J Immunol Res. 2018 Dec 9;2018:1474517. DOI: 10.1155/2018/1474517
55. Golshani M, Amani M, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Arsang A, Bouzari S. Comparison of the protective immunity elicited by a *Brucella* cocktail protein vaccine (rL7/L12 + rTOmp31 + rSOmp2b) in two different adjuvant formulations in BALB/c mice. Mol Immunol. 2018 Nov;103:306-311. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.10.002
  56. Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19 + rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. Mol Immunol. 2016 Mar;71:34-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.01.001
  57. Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Min W, et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. Vaccine. 2018 May 17;36(21):3027-3033. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.04.019
  58. Paul S, Peddayalachagiri BV, Nagaraj S, Konduru B, Batra HV. Protective and therapeutic efficacy study of divalent fusion protein rL7/L12-Omp25 against *B. abortus* 544 in presence of IFN $\gamma$ . Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Oct;102(20):8895-8907. DOI: 10.1007/s00253-018-9314-9
  59. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Bouzari S. Evaluation of immunogenicity of novel multi-epitope subunit vaccines in combination with poly I:C against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. Int Immunopharmacol. 2019 Oct;75:105829. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105829
  60. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. Infect Immun. 2001 Oct;69(10):6264-70.
  61. Onate A, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4857-61. DOI: 10.1128/iai.71.9.4857-4861.2003
  62. Sisilema-Egas F, Céspedes S, Fernández P, Retamal-Díaz A, Sáez D, Oñate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. Vaccine. 2012 Nov 26;30(50):7286-91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.09.039
  63. Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun. 2002 May;70(5):2507-11. DOI: 10.1128/iai.70.5.2507-2511.2002
  64. A Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. Vaccine. 1997;15:1851-7.
  65. Leclercq S, Harms JS, Rosinha GMS, Azevedo V, Oliveira SC. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. J Med Microbiol. 2002 Jan;51(1):20-26. DOI: 10.1099/0022-1317-51-1-20
  66. Brandsma JL, Shlyankevich M, Zelterman D, Su Y. Therapeutic vaccination of rabbits with a ubiquitin-fused papillomavirus E1, E2, E6 and E7 DNA vaccine. Vaccine. 2007 Aug 14;25(33):6158-63. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.06.012
  67. Gonzalez-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. Immunobiology. 2006;211(1-2):65-74.
  68. Singha H, Mallick AI, Jana C, Isore DP, Goswami TK, Srivastava SK, et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. Microbes Infect. 2008 Aug-Sep;10(10-11):1089-96. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.05.007
  69. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. Infect Immun. 2006 May;74(5):2734-41. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2734-2741.2006
  70. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. DNA Cell Biol. 2007 Jun;26(6):435-43. DOI: 10.1089/dna.2006.0552
  71. Hu XD, Yu DH, Chen ST, Li SX, Cai H. A combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. DNA Cell Biol. 2009 Apr;28(4):191-9. DOI: 10.1089/dna.2008.0790
  72. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, Jones S, Haynes JR, Dean HJ. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. Vaccine. 2006 May 22;24(21):4475-81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.012
  73. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. Clin Vaccine Immunol. 2007 Jul;14(7):869-74. DOI: 10.1128/CVI.00472-06
  74. Leung L, Srivastava IK, Kan E, Legg H, Sun Y, Greer C, et al. Immunogenicity of HIV-1 Env and Gag in baboons using a DNA prime/protein boost regimen. AIDS. 2004 Apr 30;18(7):991-1001. DOI: 10.1097/00002030-200404300-00006
  75. McConnell MJ, Hanna PC, Imperiale MJ. Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax. Mol Ther. 2007 Jan;15(1):203-10. DOI: 10.1038/sj.mt.6300034
  76. Perkins SD, O'Brien LM, Phillipotts RJ. Boosting with an adenovirus-based vaccine improves protective efficacy against Venezuelan equine encephalitis virus following DNA vaccination. Vaccine. 2006 Apr 24;24(17):3440-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.020
  77. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC. Partial protection against brucella infection in mice by immunization with nonpathogenic alphaproteobacteria. Clin Vaccine Immunol. 2007 Oct;14(10):1296-301. DOI: 10.1128/CVI.00459-06
  78. Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR, Park BY, Hur J. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. Can J Vet Res. 2019 Jan;83(1):68-74.
  79. Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Lotfi AS. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. Int J Nanomedicine. 2017 Dec 13;12:8769-8778. DOI: 10.2147/IJN.S149774
  80. Yousefi S, Abbassi-Dalooi T, Sekhavati MH, Tahmoorespur M. Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25-BLS *Brucella* antigen. Microb Pathog. 2018 Feb;115:50-56. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.045
  81. Diaz AG, Quinteros DA, Paolicchi FA, Rivero MA, Palma SD, Pardo RP, et al. Mucosal immunization with polymeric antigen BLS-Omp31 using alternative delivery systems against *Brucella ovis* in rams. Vet Immunol Immunopathol. 2019 Mar;209:70-77. DOI: 10.1016/j.vetimm.2019.02.005
  82. Tabatabai LB, Pugh GW. Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. Vaccine. 1994;12:919-924.
  83. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. Vaccine. 2009 Jun 24;27 Suppl 2:B3-12. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071
  84. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. Cell Mol Life Sci. 2006 Oct;63(19-20):2229-36. DOI: 10.1007/s00018-006-6311-4

# Современные требования к чумным вакцинам

П.Х.Копылов, А.П.Анисимов

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

В статье проводится сравнение основных отечественных требований к чумным вакцинам с аналогичными рекомендациями Всемирной организации здравоохранения.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, чумная вакцина, живая вакцина, молекулярная вакцина, прайм-буст иммунизация

**Для цитирования:** Копылов П.Х., Анисимов А.П. Современные требования к чумным вакцинам. Бактериология. 2019; 4(4): 42-46. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-42-46

## Modern requirements for plague vaccines

P.Kh.Kopylov, A.P.Anisimov

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

This article compares the main Russian national requirements for plague vaccines with similar recommendations of the World Health Organization.

**Keywords:** *Yersinia pestis*, plague vaccine, live vaccine, molecular vaccine, prime boost immunization

**For citation:** Kopylov P.Kh., Anisimov A.P. Modern requirements for plague vaccines. Bacteriology. 2019; 4(4): 42–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-46-46

**В** августе 2017 г. эпидемия легочной чумы охватила два крупных городских населенных пункта Мадагаскара. Было зарегистрировано более 2400 случаев и официально зафиксировано 200 смертей. Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» Роспотребнадзора были «подготовлены к отправке в адрес российского диппредставительства в Мадагаскаре средства индивидуальной защиты (защитные комбинезоны, маски, перчатки), а также 500 доз российской противочумной вакцины, произведенных Ставропольским научно-исследовательским противочумным институтом Роспотребнадзора» [1]. Несмотря на то, что основа российской живой чумной вакцины – это вакцинный штамм EV, селекционированный на Мадагаскаре, спасший там десятки тысяч жизней и переданный в 1936 г. в Россию, власти республики отказались от живой чумной вакцины, так как Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) не рекомендует использование чумных вакцин старого поколения [2, 3].

По данным ВОЗ, весной 2018 г. в различных стадиях разработки частными и государственными лабораториями зарегистрировано 17 кандидатов в чумные вакцины. Двое из

этих кандидатов завершили Фазу 2 клинических испытаний, и несколько кандидатов планировали подвергнуть клиническим испытаниям в 2019 г. Эксперты ВОЗ приступили к формулированию принципов проведения Фазы 3 испытания эффективности противочумных вакцин – кандидатов в эндемичных странах [8]. Был разработан профиль целевого продукта вакцины ВОЗ для борьбы с чумой, который должен служить «маяком» для разработчиков вакцин. В приведенной ниже таблице сравниваются параметры идеальной ВОЗовской чумной вакцины с характеристиками уже зарегистрированных в России чумных вакцин и требованиями ко вновь разрабатываемым отечественным вакцинным препаратам.

Очевидно, что представленные в таблице требования ВОЗ касаются прежде всего субъединичных вакцин на основе F1- и LcrV-антигенов, так как никто не даст разрешение на иммунизацию беременных женщин живыми вакцинами, поскольку это может привести к инфицированию вакцинным штаммом плода и даже его гибели [9]. Основной принцип специфической профилактики – вакцинация должна нести больше пользы, чем вреда. Этому соответствует поддержани-

### Для корреспонденции:

Копылов Павел Христофорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: pkopylov@obolensk.org

Статья поступила 06.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Pavel Kh. Kopylov, PhD (Biology), leading researcher, laboratory for plague microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0003

The article was received 06.11.2019, accepted for publication 20.12.2019

Таблица. Основные требования к чумным вакцинам		Живая вакцина	
Показатель	Субъединичная вакцина	Требования к вакцинному препарату	Минимальные
	Оптимальные		
Методический документ, инструкция	Наименование препарата, организации и характеристики вакцины	Основные требования к вакцинному штамму чумного микроба. МУ 3.3.1.1113-02 ЛП-004808 [4, 5]	Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, наожного скарификационного нанесения и ингаляций, № ЛП-000535 [7]
Экстренная вакцинопрофилактика	По эпидемическим показаниям	<b>Назначение и область применения</b>	
Возрастные группы	Все возрастные группы Кроме младенцев; подходит для применения беременным и кормящим женщинам, а также людям с иммунодефицитом	Взрослые, проживающие на энзоотичных по чуме территориях Лица в возрасте от 18 до 58 лет	Дети с 14 лет
Плановая вакцинопрофилактика	Лица, проживающие в эндемичных районах; специалисты, работающие с живыми культурами возбудителя чумы	Лица в возрасте от 18 до 58 лет, военнослужащие спецподразделений РХБ-защиты ВС РФ. Противопоказано использование ВЧММ на протяжении всего срока беременности. Клинические исследования влияния ВЧММ на грудных детей при вакцинации кормящих матерей не проводились	Дети с 14 лет, специалисты, работающие с живыми культурами чумного микроба, инфицированными животными материалами
Возрастные группы	Все возрастные группы, включая беременных и кормящих женщин, а также людей с иммунодефицитом	Лица в возрасте от 18 до 58 лет, военнослужащие спецподразделений РХБ-защиты ВС РФ. Противопоказано использование ВЧММ на протяжении всего срока беременности. Клинические исследования влияния ВЧММ на грудных детей при вакцинации кормящих матерей не проводились	Население с 14-летнего возраста
Экстренная вакцинопрофилактика	Отсутствие серьезных неблагоприятных последствий, связанных с применением вакцины, в том числе у лиц с нарушениями иммунного статуса и беременных	<b>Безопасность и реактогенность</b> Местные реакции в виде гиперемии, болезненности, инфильтрата, возникающие у 55% вакцинированных лиц на 1–3-и сут, проходят самостоятельно через 18–24 ч. Общие реакции в виде головных болей слабой интенсивности у 15% вакцинированных	Допустимы местные и общие реакции. Слабовыраженная гиперемия слизистой ротовой полости в области миндалин до 3 сут. Повышение температуры тела свыше 38,5°С до 3 сут. Не более 1% случаев – с полной утратой трудоспособности
Плановая вакцинопрофилактика	Допустимы легкие и преходящие нежелательные явления без серьезных побочных последствий, в том числе у людей с нарушенной иммунной функцией или у беременных	Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов»	Допустимы местные и общие реакции. Слабовыраженная гиперемия слизистой ротовой полости в области миндалин до 3 сут. Повышение температуры тела свыше 38,5°С до 3 сут. Не более 1% случаев – с полной утратой трудоспособности
Экстренная вакцинопрофилактика	Крайне предпочтителен режим однократной вакцинации	<b>Кратность вакцинации</b> Вакцинацию проводят однократно	Допустимы местные и общие реакции. Слабовыраженная гиперемия слизистой ротовой полости в области миндалин до 3 сут. Повышение температуры тела свыше 38,5°С до 3 сут. Не более 1% случаев – с полной утратой трудоспособности
Плановая вакцинопрофилактика	Предпочтителен режим однократной вакцинации	Двукратная иммунизация с интервалом в 21 сутки	Однократно путем рассасывания одной таблетки. Ревакцинация через один год, при неблагоприятной эпидемической обстановке – через 6 мес той же дозой

Защитная эффективность и иммуногенность	
Экстренная вакцинопрофилактика	<p>Эффективность не менее 80% при профилактике бубонной и легочной форм чумы в целевой группе. Развитие защитного иммунитета менее чем за 1 неделю</p> <p>Эффективность не менее 80% в профилактике бубонной и легочной форм чумы в целевой группе</p> <p>Эффективность 70% в предотвращении бубонной и легочной формы чумы, останова передачи чумы в затронутую популяцию. Развитие защитного иммунитета, менее чем за 10 сут</p> <p>Не менее 70% эффективности в профилактике бубонной и легочной формы чумы в целевой группе</p> <p>Выживание не менее 80% животных, зараженных на 21-е сут 200 DCL (~2000 LD<sub>50</sub>) вирулентного штамма чумного микроба и не менее 50% животных, зараженных на 7-е сутки.</p> <p>Защита от чумы не менее 80% морских свинок, иммунизированных аэрогенно 2-8 × 10<sup>6</sup> КОЕ</p>
Плановая вакцинопрофилактика	<p>Защита не менее 2 лет</p> <p>Длительная защита в течение 10 лет и более после первичной вакцинации; может поддерживаться в течение неопределенного времени с помощью бустерных доз</p> <p>Вакцина вызывает развитие иммунитета к чуме длительностью до одного года</p>
Продолжительность защиты	
Экстренная вакцинопрофилактика	Защита не менее одного года
Плановая вакцинопрофилактика	Длительная защита в течение не менее 5 лет после первичной вакцинации; может поддерживаться в течение неопределенного времени с помощью бустерных доз
Путь введения	
Экстренная вакцинопрофилактика	Оральный или другой непарентеральный способ вакцинации, обеспечивающий быструю массовую иммунизацию
Плановая вакцинопрофилактика	Оральный/другой непарентеральный путь. Способ, совместимый с использованием в рутинных программах иммунизации
Подкожным, накожным, внутрикожным или ингаляционным путями	Подкожно в верхнюю треть наружной поверхности плеча
Таблетки для рассасывания	Определяется разработчиком вакцины
Стабильность продукта и условия хранения	
Экстренная вакцинопрофилактика	<p>Срок годности – 3 года.</p> <p>Транспортировка и хранение при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.3332-16</p> <p>12 месяцев при –20 °С. Один месяц при 2–8 °С</p> <p>Высоких температурах вне холодильной цепи в течение нескольких дней</p> <p>Стабильность при комнатной температуре в течение 2–3 лет. Не менее 5 лет при 2–8 °С.</p>
Плановая вакцинопрофилактика	<p>Срок годности 1 год.</p> <p>Транспортировка и хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 0 до 8 °С</p> <p>Транспортировка и хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С</p> <p>12 месяцев при –20 °С. 6 месяцев при 2–8 °С</p>
Совместное введение с другими вакцинами	
Экстренная вакцинопрофилактика	<p>Допускается одновременное введение ВЧММ с доксициклином в дозе до 200 мг в сутки. Взаимодействие с другими лекарственными средствами и вакцинами не изучалось</p> <p>Не оговаривается</p>
Плановая вакцинопрофилактика	<p>Допускается одновременная оральная вакцинация взрослых против чумы и накожная против бруцеллеза и туляремии на разных участках наружной поверхности верхней трети плеча</p> <p>Допускается одновременная накожная вакцинация взрослых против чумы, бруцеллеза и туляремии за и туляремии</p> <p>Определяется доклиническими испытаниями</p>

ваемая ВОЗ «стратегия кокона», при которой беременных или кормящих не иммунизируют, а вакцинируют всех, с кем они контактируют и от кого могут заразиться [10].

Конечная цель вакцинации состоит в стимулировании напряженного и длительного иммунитета. Однако в случае чумы иммунитет, вызываемый вакцинацией, со временем ослабевает [11]. Субъединичные вакцины на основе F1 и LcrV в основном вызывают гуморальный иммунный ответ [12]. Хотя эти вакцины показали многообещающие результаты на животных моделях, их защитный потенциал у людей еще предстоит оценить. Например, было объявлено, что вакцина на основе rF1-V будет лицензирована в 2021 г. для использования армией США по процедурам FDA, которые применяются, когда определение эффективности испытаний препаратов на людях признается неэтичным или непрактичным [13]. Гуморальный иммунный ответ – выработка антител, которые нейтрализуют внеклеточные микробы, тогда как клеточный иммунный ответ опирается на Т-клетки, которые экспрессируют цитокины и активно разрушают внутриклеточные микробы. Защитный эффект субъединичных вакцин краткосрочный, поскольку в основном зависит от гуморального иммунитета, который периодически необходимо стимулировать бустерными иммунизациями. Вакцины против чумы следующего поколения должны быть разработаны для стимулирования напряженного клеточного иммунитета. Оба ответа, гуморальный и клеточный, в сочетании способствуют эффективности вакцины.

Еще одним направлением повышения эффективности вакцинных препаратов является введение в их состав адьювантов [14]. Одним из примеров прототипов таких вакцин может служить генетически аттенуированный штамм *Yersinia pseudotuberculosis*, продуцирующий антиген F1 *Y. pestis* и вызывающий мощный клеточный ответ даже после однократного орального введения [15]. Принимая во внимание настоятельную позицию ВОЗ в отношении живых вакцин, вопрос о том, имеет ли такой прототип перспективы в рамках дорогостоящих фаз доклинических и клинических испытаний, приобретает критическое значение. Достижение заявленных ВОЗ сроков сохранения потребительских свойств вакцинных препаратов (длительность иммунитета) на сегодняшний день представляется маловероятным без использования адьювантов и/или схемы прайм-буст иммунизации: вначале грунд-иммунизация живой чумной вакциной, а затем, по мере необходимости, ревакцинация молекулярной вакциной [16].

Исследования по совершенствованию вакцинопрофилактики чумы продолжаются.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 г.).

### Литература

1. Информация Роспотребнадзора «О направлении в Республику Мадагаскар противочумной вакцины и средств индивидуальной защиты» [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=9072](https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=9072)
2. 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

3. WHO Plague vaccines workshop April 23 2018 [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague\\_vaccines\\_workshop-23-april-2018/en/](https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/)
4. Справочник лекарств издательской группы «ГЭОТАР-Медиа» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.lsgeotar.ru/vaktsina-chumnaya-molekuliarnaya-mikroinkapsulirovannaya-vchmm-17308.html>
5. Регистр лекарственных средств России: «Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ)» [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_96317.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_96317.htm)
6. Регистр лекарственных средств России: «Вакцина чумная живая сухая (*Vaccinum pestosum vivum*)» [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_8626.htm](https://rlsnet.ru/tn_index_id_8626.htm)
7. Регистр лекарственных средств России: «Вакцина чумная живая – регистрационное удостоверение ЛП-000535» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://rlsnet.ru/regdoc/36996>
8. WHO. Efficacy trials of plague vaccines: endpoints, trial design, site selection. WHO workshop in Paris, 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVxeval\\_FinalMeeting\\_Report.pdf?ua=1](http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVxeval_FinalMeeting_Report.pdf?ua=1)
9. Verma R, Khanna P, Dhankar M. Vaccination during pregnancy: Today's need in India. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2016;12(3):668-670. DOI: 10.1080/21645515.2015.1093265
10. Merzaglia M, Ferrara L, Melegaro A, Demicheli V. Parent "cocoon" immunization to prevent pertussis-related hospitalization in infants: the case of Piemonte in Italy. *Vaccine.* 2013 Feb 6;31(8):1135-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.061
11. Wagner DA, Kelly SM, Petersen AC, Peroutka-Bigus N, Darling RJ, Bellaire BH, et al. Single-dose combination nanovaccine induces both rapid and long-lived protection against pneumonic plague. *Acta Biomater.* 2019. Dec 100:326-337. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.10.016
12. Demeure ChE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun.* 2019. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0
13. FDA. Code of federal regulations. Title 21 (7), Chapter 1F-Biologics. Part 601: Licensing, subpart H: Approval of biological products when human efficacy studies are not ethical or feasible. Revised 2018.
14. Amemiya K, Meyers JL, Rogers TE, Fast RL, Bassett AD, Worsham PL, et al. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine.* 2009. Apr 6;27(16):2220-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016
15. Derbise A, Hanada Y, Khalifé M, Carniel E, Demeure CE. Complete protection against pneumonic and bubonic plague after a single oral vaccination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004162.
16. Glynn A, Roy CJ, Powell BS, Adamovicz JJ, Freytag LC, Clements JD. Protection against aerosolized *Yersinia pestis* challenge following homologous and heterologous prime-boost with recombinant plague antigens. *Infect Immun.* 2005. Aug;73(8):5256-61.

### References

1. Information of Rosпотребнадзор «About sending the plague vaccine to the Republic of Madagascar the plague vaccine and personal protective equipment» [Electronic resource] Access mode: [https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=9072](https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=9072)
2. 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
3. WHO Plague vaccines workshop April 23 2018 [Electronic resource]. Access mode: [https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague\\_vaccines\\_workshop-23-april-2018/en/](https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/)
  4. Publishing Group Drug Directory «GEOTAR-Media» [Electronic resource]. Access mode: <https://www.lsgeotar.ru/vaktsina-chumnaya-molekuliarnaya-mikroinkapsulirovannaya-vchmm-17308.html>
  5. Russian Medicines Register: «Plague molecular microencapsulated vaccine (PMMV)» [Electronic resource]. Access mode: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_96317.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_96317.htm)
  6. Russian Medicines Register: «Vaccinum pestosum vivum» [Electronic resource]. Access mode: [https://rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_8626.htm/](https://rlsnet.ru/tn_index_id_8626.htm/)
  7. Russian Medicines Register: «Vaccinum pestosum vivum – registration certificate ЛП-000535» [Electronic resource]. Access mode: <https://rlsnet.ru/regdoc/36996>
  8. WHO. Efficacy trials of plague vaccines: endpoints, trial design, site selection. WHO workshop in Paris, 2018. [Electronic resource]. Access mode: [http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVxeval\\_FinalMeetingReport.pdf?ua=1](http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVxeval_FinalMeetingReport.pdf?ua=1).
  9. Verma R, Khanna P, Dhankar M. Vaccination during pregnancy: Today's need in India. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2016;12(3):668-670. DOI: 10.1080/21645515.2015.1093265
  10. Meregaglia M, Ferrara L, Melegaro A, Demicheli V. Parent "cocoon" immunization to prevent pertussis-related hospitalization in infants: the case of Piemonte in Italy. *Vaccine.* 2013 Feb 6;31(8):1135-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.061
  11. Wagner DA, Kelly SM, Petersen AC, Peroutka-Bigus N, Darling RJ, Bellaire BH, et al. Single-dose combination nanovaccine induces both rapid and long-lived protection against pneumonic plague. *Acta Biomater.* 2019. Dec 100:326-337. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.10.016
  12. Demeure ChE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun.* 2019. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0
  13. FDA. Code of federal regulations. Title 21 (7), Chapter 1F-Biologics. Part 601: Licensing, subpart H: Approval of biological products when human efficacy studies are not ethical or feasible. Revised 2018.
  14. Amemiya K, Meyers JL, Rogers TE, Fast RL, Bassett AD, Worsham PL, et al. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine.* 2009. Apr 6;27(16):2220-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016
  15. Derbise A, Hanada Y, Khalifé M, Carniel E, Demeure CE. Complete protection against pneumonic and bubonic plague after a single oral vaccination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0004162.
  16. Glynn A, Roy CJ, Powell BS, Adamovicz JJ, Freytag LC, Clements JD. Protection against aerosolized *Yersinia pestis* challenge following homologous and heterologous prime-boost with recombinant plague antigens. *Infect Immun.* 2005. Aug;73(8):5256-61.

#### Информация об авторе:

Анисимов Андрей Павлович, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

#### Information about author:

Andrey P. Anisimov, ScD (Med.), Deputy Director for Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

## НОВОСТИ НАУКИ

### Интраназальная вакцина против сибирской язвы: BlueWillow получает разрешение FDA для начала фазы 1 исследования



Разработка интраназальной вакцины против сибирской язвы продолжается в рамках партнерства BlueWillow с Porton Biopharma Limited (PBL) по контракту №HHSN272201600045C от NIAID на разработку вакцины против сибирской язвы NanoVax® следующего поколения. Контракт может стоить до 24 миллионов долларов в течение восьмилетнего срока, если будут исполнены все опционы. Вакцина сочетает в себе новую интраназальную систему NanoVax от BlueWillow с рекомбинантным защитным антигеном (rPA) для сибирской язвы от PBL. На платформе NanoVax используется запатентованный адъювант наноэмульсия масло-в-воде, который вызывает системный и слизистый иммунитет, обеспечивая уникальную защиту от таких респираторных инфекций, как сибирская язва.

Вакцина против сибирской язвы BlueWillow/PBL может обеспечить значительные преимущества по сравнению с существующей вакциной для инъекций. Исследования на животных показали, что BW-1010 безопасна и обеспечивает защиту от сибирской язвы после одной или двух прививок. Кроме того, неофициальные исследования стабильности показали, что срок годности вакцины составляет более пяти лет по сравнению с тремя годами для текущей инъекционной вакцины. Улучшенная стабильность BW-1010 позволит обеспечить более длительное хранение, что потенциально может сэкономить правительству США более 100 миллионов долларов в год.

*Intranasal anthrax vaccine: BlueWillow Receives FDA Clearance to Begin Phase 1 Study – Outbreak News Today [Electronic resource].*

URL: <http://outbreaknewstoday.com/intranasal-anthrax-vaccine-bluewillow-receives-fda-clearance-to-begin-phase-1-study-22916/> (accessed: 14.12.2019).

# Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости зоонозным кожным лейшманиозом на территории Узбекистана

Ж.А.Мустанов, А.С.Неъматов

*Термезский филиал Ташкентской медицинской академии, Термез, Республика Узбекистан*

В последние годы в Узбекистане заболеваемость лейшманиозом относительно увеличивается. Заболеваемость по годам и регионам распределяется неравномерно, такая эпидемиологическая особенность, видимо, связана с наличием разнообразных источников возбудителей инфекции и особенностями социальных и природных факторов, влияющих на эпидемический процесс лейшманиозов.

*Ключевые слова: кожный лейшманиоз, эпидемиология, ретроспективный анализ*

**Для цитирования:** Мустанов Ж.А., Неъматов А.С. Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости зоонозным кожным лейшманиозом на территории Узбекистана. Бактериология. 2019; 4(4): 47–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-47-49

## Retrospective epidemiological analysis of the leishmaniasis in Uzbekistan

Zh.A.Mustanov, A.S.Nematov

*Termez branch of Tashkent Medical Academy, Termez, Republic of Uzbekistan*

In recent years, the incidence of leishmaniasis in Uzbekistan has increased relatively. The incidence across years and regions is unevenly distributed, such an epidemiological feature is apparently associated with the presence of a variety of sources. The causative agents of infection and the characteristics of social and natural factors affecting the epidemic process of leishmaniasis.

*Key words: cutaneous leishmaniasis, epidemiology, retrospective analysis*

**For citation:** Mustanov Zh.A., Nematov A.S. Retrospective epidemiological analysis of the leishmaniasis in Uzbekistan. Bacteriology. 2019; 4(4): 47–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-47-49

**Л**ейшманиоз – протозойное заболевание людей и животных, которое вызывается лейшманией и передается через укус комаров. Это тропическое заболевание эндемично в 98 странах мира [1–5]. По данным ВОЗ, 350 млн людей заражаются этой болезнью, и ежегодно у 14 млн человек диагностируется кожный лейшманиоз. В Узбекистане распространены как кожный, так и зоонозный лейшманиоз [2, 4, 6].

Зоонозный или острый некротический кожный лейшманиоз (ЗКЛ) в различные времена назывался разными названиями, которые отдельные авторы считают синонимами: сельский лейшманиоз; восточная язва; острый некротический лейшманиоз [7].

Кожный лейшманиоз распространен в Центральной Азии (Туркменистан, Узбекистан), на Кавказе, в Афганистане, на Ближнем Востоке и в Африке, чаще возникает с разви-

тием туризма не только в эндемичных, но и в других географических районах. Эндемические очаги находятся в основном в пустынных, сельских и городских районах [1, 2, 4, 5, 8, 9].

Территория Узбекистана подразделяется на 2 основные зоны природных очагов:

- эндемичные районы с высокоактивными природными очагами: Джаркурганский, Термезский, Ангорский и Музrabадский районы Сурхандарьинской области; Караульский рынок и Бадахшанский массив Бухарской области, Карнабчул Навоийской области, Джизакская область и районы голодной пустыни;

- районы с низким уровнем эпидемически активных природных очагов: Сурхандарья, Синдикли, Язъяванская, Кызылкумская и Каракалпакская пустыни и Ферганская область. Распространенность природных очагов кожного лейшманиоза в Узбекистане связана с крупными песчаными

### Для корреспонденции:

Мустанов Жавахир Абдусамат ўғли, ассистент кафедры микробиологии Термезского филиала Ташкентской медицинской академии

Адрес: Республика Узбекистан, 132000, Сурхандарьинская область, Термез, ул. Ислама Каримова, 64

E-mail: mustanovjavohir@mail.ru

Статья поступила 29.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Zhavokhir Abdusamat ўfli Mustavan, assistant, department of microbiology, Termez branch of Tashkent Medical Academy

Address: 64 Islam Karimov str., Termez, Surkhandarya region, 132000, Republic of Uzbekistan

E-mail: mustanovjavohir@mail.ru

The article was received 29.11.2019, accepted for publication 20.12.2019



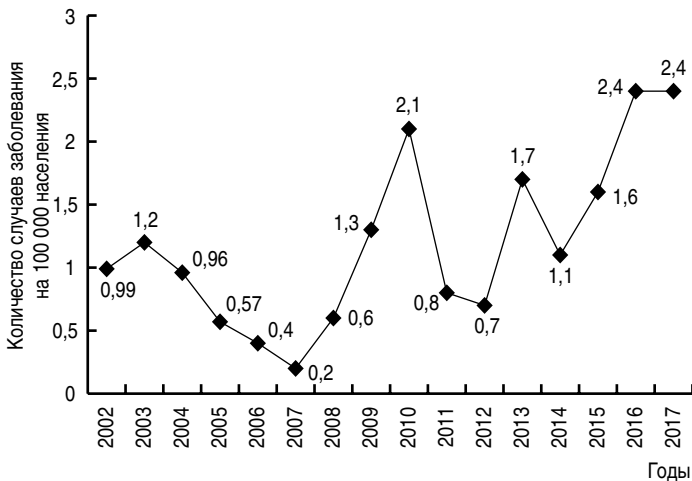


Рис. 1. Динамика кожного лейшманиоза в Республике Узбекистан в 2002–2017 гг.

мышами, которые являются основным источником возбудителя инфекции [6].

Возбудитель заболевания относится к семейству *Trypanosomidae*. Москиты, на которых паразитируют *Trypanosomidae*, встречаются в основном в населенных пунктах, в мусорных свалках, птичьих гнездах, норах грызунов и трещинах в пещерах. Москиты активны ночью. Большая песчанка – многочисленный (фоновый) вид на всей равнинной территории республики. Сохраняет лейшманию всю жизнь. Ведет групповой образ жизни в сложной норе с оптимальным для переносчика микроклиматом. Неохотно роет новые норы, используя при миграции старые. Нора может существовать независимо и служит элементарным природным очагом ЗКЛ [4, 5, 6, 7, 9].

Чтобы снизить заболеваемость кожным лейшманиозом, необходимо улучшить меры по устранению его естественных очагов.

**Цель исследования** – провести ретроспективный эпидемиологический анализ особенностей распространения кожного лейшманиоза в республике.

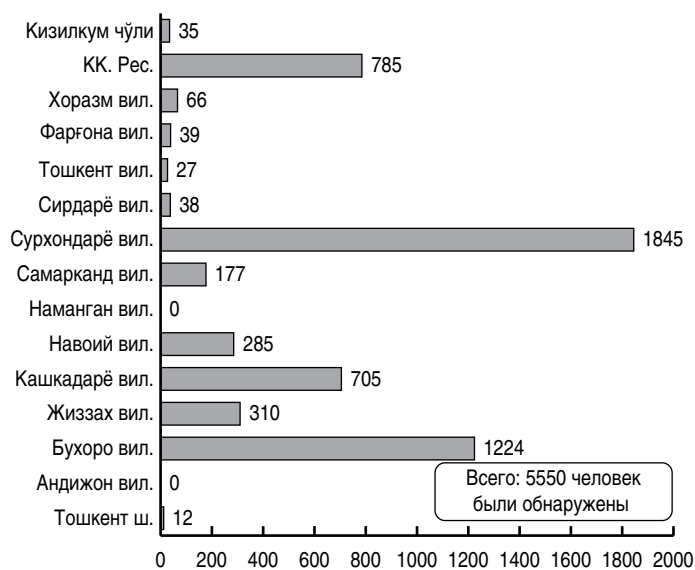


Рис. 2. Заболеваемость кожным лейшманиозом в Республике Узбекистан в 2002–2017 гг. (в абсолютных цифрах).

## Материалы и методы

Официальные отчетные данные Республики Узбекистан и областных Центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора о заболеваемости кожным лейшманиозом в 2002–2017 гг. Были использованы эпидемиологические, паразитологические и статистические методы исследования.

## Результаты и обсуждение

В настоящее время меры против кожного лейшманиоза показали некоторую эффективность, но их недостаточность. Анализ кожного лейшманиоза, зарегистрированного в Республике Узбекистан за период 2002–2017 гг., показывает, что заболеваемость на 100 000 человек в этот период варьирует в пределах 0,2–2,4 (рис. 1). В 2002 г. (первый год анализа) заболеваемость кожным лейшманиозом в нашей стране составляла 0,99 на 100 000 населения, самый низкий показатель за анализируемые годы составил 0,2 на 100 000 населения в 2007 г., самый высокий – 2,4 на 100 000 населения – в 2016 г. С 2005 г. наблюдается тенденция к росту заболеваемости кожным лейшманиозом. Заболеваемость увеличилась до 2,1 в 2009–2010 гг., что 10-кратно превышает уровень 2007 г. В 2011–2012 гг. уровень заболеваемости несколько снизился и вновь начал расти с 2013 г. В 2016–2017 гг. уровень заболеваемости составил 2,4 на 100 000 населения, что в 12 раз больше, чем в 2007 г. (рис. 1).

Таким образом, ретроспективный эпидемиологический анализ кожного лейшманиоза, зарегистрированного в Республике Узбекистан за 2002–2017 гг., показывает, что в течение многих лет наблюдается тенденция к увеличению количества случаев заболевания. В то же время в течение анализируемого периода уровень заболеваемости в стране постоянно колебался. Основными причинами этого являются численность грызунов, заражение москитами и их активность в естественном очаге, зависимость от общения населения, то есть функционирования населения в природных очагах для различных целей. Например, работа в сельском хозяйстве, освоение пустынных земель, выпас скота и овец и др. Заболеваемость кожным лейшманиозом обусловлена факторами окружающей среды в районе и естественными источниками заболевания, количеством носителей возбудителя в них. Заболеваемость кожным лейшманиозом в разных регионах страны весьма различна (рис. 2).

Представленные данные показывают, что в период 2002–2017 гг. в стране было зарегистрировано 5550 случаев кожного лейшманиоза, из них в Сурхандарьинской области – 1845, в Бухарской области – 1224, в Республике Каракалпакстан – 785, в Кашкадарьинской области – 705. В Джизакской, Навоийской и Самаркандской областях было зарегистрировано относительно немного случаев, в то время как в Наманганской и Андижанской областях – ни одного.

Таким образом, ретроспективный анализ случаев кожного лейшманиоза в административных районах республики за последние 16 лет (2002–2017 гг.) показывает, что в регионах с наиболее высокой заболеваемостью имеются актив-

ные эпизоотические источники и естественные источники заболевания.

### Выводы

1. Заболеваемость лейшманиозом распределена по годам и по регионам неравномерно, и эта эпидемиологическая особенность, вероятно, связана с тем, что источники заболевания различны в разных регионах.

2. Подобная ситуация требует проведения специальных исследований по углубленному изучению эпидемиологии заболевания.

3. Необходимо принять комплексные меры против лейшманиоза, в том числе дератизацию мест обитания песчаных грызунов, сокращение механическим методом численности крупных песчаных грызунов, обеззараживание гнезд для борьбы с москитами, предоставление средств индивидуальной защиты от москитов.

4. Раннее выявление и лечение заболевания, эпидемиологическое обследование населения.

5. Проведение специальной профилактики в соответствии с эпидемическими инструкциями.

### Литературы

1. Агакишев ДД, Гаджиева АТ, Гусейнова ВР. Эволюция клинических проявлений кожного лейшманиоза, приводящих к диагностическим ошибкам. Вестник дерматологии и венерологии. 2005;3:64-65.
2. Потекаев НС, Потекаев НН, Львов АН, Пташинский РИ, Кочетков МА, Лебедева ЕВ, Маляренко ЕН, Сапожникова НА. Зоонозный кожный лейшманиоз: исторический экскурс и клиническое наблюдение. Клиническая дерматология и венерология. 2015;14(5):41-50.
3. Баткаев ЭА. Лейшманиоз кожи. Вестник последипломного медицинского образования. 2001;4:56-8.
4. Исаева МС, Саидинова ТО. Современные аспекты кожного лейшманиоза. Вестник Авиценны. 2016;1(66):116-22.
5. Мустафаев ХМ. Эпидемиологическая ситуация по зоонозному кожному лейшманиозу в Узбекистане. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1991;6:24-26.

6. Абидова М, Рахимов ИР, Абдурахманова НА, Салиходжаева СС. Случай кожного лейшманиоза. Вестник дерматологии и венерологии. 2016;3:83-7.
7. Покровский ВИ, Пак СГ, Брико НИ, Данилкин БК. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, с. 626-632.
8. Абдуллаев ДМ. Лечение кожного лейшманиоза иммуномодулятором гепон. Материалы V съезда дерматовенерологов Узбекистана. Ташкент, 2008, с. 9-10.
9. Заславский ДВ, Андриенко ЕМ, Александрова ИЮ, Матвеева ЕЛ, Семенова СЕ, Зуев МЕ, Гайдук АА. Верификация лейшманиоза кожи. Вестник дерматологии и венерологии. 2014;5:91-5.

### References

1. Agakishiev DD, Gadjieva AT, Guseinova VR. Evolution of clinical manifestations of cutaneous leishmaniasis as a source of diagnostic errors. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2005;3:64-65. (In Russian).
2. Potekaev NS, Potekaev NN, L'vov AN, Ptashinskiy RI, Kochetkov MA, Lebedeva EV, Malyarenko EN, Sapozhnikova NA. Zoonotic cutaneous leishmaniasis: historical review and a case study. Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology (Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya). 2015;14(5):41-50. (In Russian).
3. Batkaev EA. Leishmanioz kozhi. Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya. 2001;4:56-8. (In Russian).
4. Isayeva MS, Saidinova TS. Modern aspects of cutaneous leishmaniasis. Avicenna Bulletin. 2016;1(66):116-22. (In Russian).
5. Mustafaev KhM. Epidemiologicheskaya situatsiya po zoonoznomu kozhnomu leishmaniozu v Uzbekistane. Medical Parasitology and Parasitic Diseases 1991;6:24-26. (In Russian).
6. Abidova M, Rakhimov IR, Abdurakhmanova NA, Salikhodzhaeva SS. Sluchai kozhnogo leishmanioza. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2016;3:83-7. (In Russian).
7. Pokrovskii VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK. Infektsionnye bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2007, pp. 626-632. (In Russian).
8. Abdullayev DM. Treatment of cutaneous leishmaniasis with the immunomodulator Gepon. Proceedings of the V Congress of dermatovenerologists of Uzbekistan. Tashkent, 2008, pp. 9-10. (In Russian).
9. Zaslavsky DV, Andriyenko YeM, Aleksandrova IY, Matveyeva YeL, Semyonova SYe, Zuyev ME, Gaiduk AA. Verification of cutaneous leishmaniasis. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2014;5:91-5. (In Russian).

## Главный санитарный врач Великобритании: массовое применение антибиотиков в кормах животных представляет гораздо большую угрозу для людей, чем глобальное потепление

Организм человека вырабатывает устойчивость к антибиотикам через супербаги, которые могут производить фермент, ослабляющий антибиотики и создающий заслон, не дающий им попасть в организм и начать действовать.

Антибиотики – основа современной медицины, без них нельзя провести любую хирургическую операцию. А из-за устойчивости к ним только в Британии ежегодно могут умирать по несколько миллионов человек. Некоторые инфекции, включая туберкулез, устойчивы к антибиотикам, которые раньше были эффективны против них.

Причина выработки устойчивости микроорганизма к антибиотикам кроется в применении гармонов роста в животноводстве. Врач предостерегает от импорта мяса и рыбы из стран, в которых злоупотребляют антибиотиками в сельском хозяйстве, прежде всего, из США. По данным экспертов, до 70% мяса там производится с применением антибиотиков.

# Разработка системы дот-иммуноанализа для контроля О-АГ сероваров Инаба и Огава в производстве холерной химической вакцины

С.А.Воробьева, О.С.Дуракова, О.А.Волох, М.Н.Киреев, О.В.Громова, О.Д.Клокова

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

На всех этапах производства холерная бивалентная химическая вакцина проходит контроль специфических компонентов, содержащихся в готовом препарате. Одним из важных составляющих лекарственной формы является О-антиген, активность которого, согласно требованиям GMP, необходимо контролировать. Выявлено падение активности после двух лет хранения, однако значения укладываются в установленные нормы. Нами показана высокая чувствительность дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе иммуноглобулинов, меченных коллоидным золотом, и оценена его возможность в качественном определении О-антигена сероваров Инаба и Огава.

*Ключевые слова:* дот-иммуноанализ, О-антигены Инаба и Огава, иммуноглобулины, холерная бивалентная химическая вакцина

**Для цитирования:** Воробьева С.А., Дуракова О.С., Волох О.А., Киреев М.Н., Громова О.В., Клокова О.Д. Разработка системы дот-иммуноанализа для контроля О-АГ сероваров Инаба и Огава в производстве холерной химической вакцины. Бактериология. 2019; 4(4): 50–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-50-54

## Development of the dot immuno analysis system for control of the serobar specific O-antigens Inaba and Ogawa in the production of cholera chemical vaccine

S.A.Vorobyova, O.S.Durakova, O.A.Volokh, M.N.Kireev, O.V.Gromova, O.D.Klokova

Russian Research Antiplague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

At all stages of production, a cholera bivalent chemical vaccine passes control of the specific components contained in the finished product. One of the important components of the dosage form is O-antigen, the activity of which, according to GMP, must be controlled. A drop in activity after 2 years of storage was detected, but the values fit into the established norms. We have shown the high sensitivity of dot-immunoassay using a conjugate based on immunoglobulins labeled with colloidal gold and evaluated its ability to qualitatively determine the O-antigen of the Inaba and Ogawa serovars.

*Keywords:* dot-immunoassay, Inaba and Ogawa O-antigens, immunoglobulins, cholera bivalent chemical vaccine

**For citation:** Vorobyova S.A., Durakova O.S., Volokh O.A., Kireev M.N., Gromova O.V., Klokova O.D. Development of the dot immuno analysis system for control of the serobar specific O-antigens Inaba and Ogawa in the production of cholera chemical vaccine. Bacteriology. 2019; 4(4): 50–54. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-50-54

**В** России вакцинация против холеры включена в Национальный календарь профилактических прививок в соответствии с Приказом Минздрава России № 125н от 21.03.2014 (приложение № 2). В настоящее время в мире зарегистрировано несколько противохолерных вакцин [1],

среди которых единственная на территории Российской Федерации вакцина холерная бивалентная химическая разработана и выпускается в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Ее основными компонентами являются холероген-анатоксин и О-антигены (О-АГ) холерного вибриона сероваров Инаба

### Для корреспонденции:

Воробьева Светлана Александровна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 26-2131

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 09.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Svetlana A. Vorobyova, junior researcher, laboratory of cholera vaccine Russian Research Antiplague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

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

Phone: (8452) 26-2131

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 09.11.2019, accepted for publication 20.12.2019

и Огава, отвечающие за формирование антибактериального иммунитета [2]. Вакцина рекомендована для лиц, выезжающих в эндемичные страны, а также населению районов, граничащих с неблагополучными по холере территориями, в случае неблагоприятной обстановки [3].

В условиях производства вакцины актуален вопрос о методах контроля готового препарата и специфических компонентов, входящих в его состав. Проверка как лиофилизированных О-АГ, так и таблетки холерной вакцины производится по комплексу методов *in vivo* и *in vitro* [4]. В настоящее время в соответствии с нормативно-технической документацией контроль специфической активности О-АГ осуществляют с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Однако эта реакция не отвечает требованиям экспрессности и высокой чувствительности, а также происходит оценка активности общей фракции О-антигена, независимо от серовара. Поскольку в настоящее время актуально стремление к минимизации времени, упрощению методики и повышению чувствительности анализа, актуален вопрос внедрения таких методов в производство холерной бивалентной химической вакцины. К числу чувствительных иммунодиагностических тестов, с помощью которых возможна детекция антигенов, относится твердофазный иммуноферментный анализ и его дот-вариант на нитроцеллюлозной мембране.

Дот-иммуноанализ (ДИА) – является одним из наиболее эффективных и доступных методов, характеризуется высокой чувствительностью, простотой и быстротой выполнения. Проблема специфичности иммунологических систем успешно решается использованием иммуноглобулинов, что особенно важно при проведении высокочувствительных тестов. Многими авторами отмечаются высокие показатели чувствительности и специфичности ДИА по сравнению с методами классического иммуноферментного анализа [5–7] и РНГА [8].

Для учета и визуализации результатов дот-анализа используются хромогенные метки, обеспечивающие окрашивание участков иммунного взаимодействия, в качестве которых могут выступать ферменты [9] и наночастицы коллоидных металлов [10]. Применение конъюгатов на основе золотых наночастиц в ДИА делает метод высокочувствительным, простым, быстрым и дешевым [11, 12].

В связи с вышеизложенным, **целью настоящей работы** являлось изучение возможности применения дот-иммуноанализа для оценки активности О-АГ, входящих в состав холерной химической вакцины.

## Материалы и методы

В качестве антигенных препаратов использовали лиофилизированные О-АГ сероваров Инаба и Огава, полученные из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов О1 серогруппы *Vibrio cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М41 классического биовара серовара Огава [13].

Имуноглобулины выделяли из кроличьих и лошадиных гипериммунных специфических холерных сывороток сероваров Инаба и Огава методом фракционирования сульфатом аммония [14], с последующим диализом против

0,01М фосфатно-солевого буферного раствора. Определение белка в диализате проводили по методу Лоури при  $\lambda = 750$  нм [15]. Лошадиные сыворотки получали путем иммунизации корпускулярными антигенами холерных вибрионов сероваров Инаба и Огава, любезно предоставленными сотрудниками лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Нами были получены экспериментальные кроличьи сыворотки на О-АГ Инаба и Огава. Схема иммунизации состояла из 6 внутривенных инъекций в дозах от 0,5 до 2 мг с интервалом 4 суток. Эффективность иммунного ответа определяли в реакции диффузионной преципитации.

Приготовление коллоидного раствора золота с диаметром частиц 15–17 нм осуществляли по методу Г.Френса [16]. Определение «золотого числа» проводили по методике Р.Жигмонди [17].

При постановке ДИА в прямом варианте в качестве конъюгата использовали иммуноглобулины, меченные коллоидным золотом. Для связывания частиц маркера в раствор коллоидного золота добавляли при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке необходимое количество иммуноглобулинов в соответствии с выявленным «золотым числом». Стабилизацию полученных конъюгатов проводили 0,5%-м раствором ПЭГ-20000 до конечной концентрации 0,02%, при перемешивании в течение 15 минут. Затем выдерживали раствор 1 ч при 3–5°C, после чего применяли для работы.

При учете результатов в качестве титра препарата антигена принимали наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое цветное пятно. При наличии слабого окрашивания проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембрану погружали в раствор физического проявителя (метол, лимонная кислота и азотнокислое серебро).

Постановку РНГА осуществляли по стандартной методике микрометодом в 3 повторностях. В качестве специфической сыворотки использовали коммерческую «Сыворотку диагностическую холерную О1 адсорбированную сухую для РА» производства института «Микроб».

Для определения стабильности О-АГ в эксперимент были взяты лиофилизированные О-АГ сероваров Инаба и Огава с разным сроком хранения, по 3 серии каждого серовара.

## Результаты и обсуждение

Ранее нами была показана высокая чувствительность непрямого варианта ДИА с использованием белка А, меченного коллоидным золотом, в обнаружении О-АГ как в специфических фракциях, так и в готовой лекарственной форме вакцины [18, 19]. При этом была обнаружена корреляция с методом РНГА. Данный вариант ДИА позволяет избежать всех недостатков РНГА: трудоемкости, невысокой чувствительности, длительности постановки, требования большого числа реактивов, сложной пробоподготовки при постановке реакции на готовом препарате холерной бивалентной химической вакцины.

Согласно требованиям GMP необходимо оценивать специфическую активность всех компонентов, входящих в состав

Таблица 1. Определение специфической активности О-АГ Инаба и Огава в зависимости от срока их хранения

№ п/п	О-АГ	% от начальной активности		
		через год хранения	через 2 года хранения	через 3 года хранения
1	О-АГ Огава	100	88 ± 1	88 ± 1
2	О-АГ Инаба	100	88 ± 0,1	76 ± 0,1

препарата. В состав холерной химической вакцины входят О-АГ холерного вибриона сероваров Инаба и Огава, причем их активность отражается на эффективности действия готового препарата и необходим контроль их содержания в процессе производства. Одна таблетка должна содержать не менее 2000 условных единиц (обратный показатель титра в РНГА) О-АГ *V. cholerae* O1 [20]. Лиофилизированные О-АГ Огава должны иметь титр в РНГА не менее 1:100, О-АГ Инаба – не менее 1:50.

Нами проведено определение специфической активности лиофилизированных препаратов О-АГ Инаба и Огава с разным сроком хранения: от 3,5 года и до 1 года (табл. 1). На протяжении исследования образцы находились при температуре +8°C, рекомендованной для хранения холерной вакцины [20]. Активность антигенов измеряли при получении (начальная активность) и по истечении определенного срока хранения (активность в эксперименте), затем вычисляли процент активности от начального значения. В табл. 1 представлены средние показатели трех серий О-АГ Инаба и трех серий О-АГ Огава.

Установлено незначительное изменение активности после двух лет хранения (падение титра на 12 ± 1%). Этот уровень активности сохранялся в течение последующего хранения. Следует отметить, что все полученные данные со-

ответствуют показателям, устанавливаемым нормативной документацией.

В настоящее время для увеличения скорости получения результата, чувствительности и специфичности анализа используют методы, основанные на твердофазном иммуноферментном анализе, в частности его модификации – ДИА.

Поскольку ранее нами был использован непрямой вариант ДИА [19, 20], следующим шагом стало повышение чувствительности и специфичности ДИА, для чего в качестве конъюгата использовали иммуноглобулины G, меченные коллоидным золотом. Следует отметить, что данный метод сокращает время анализа с двух часов до 30 минут.

Нами показана корреляция между полученными данными и результатами РНГА и непрямым ДИА с коллоидным золотом (табл. 2).

Стоит отметить высокую корреляционную зависимость лошадиных иммуноглобулинов к О-АГ Инаба, а также меньшее количество перекрестных реакций с гетерологичным антигеном.

Поскольку в эксперименте нами не выявлена достаточная специфичность взаимодействия между выделенными лошадиными иммуноглобулинами и антигенами сероваров Инаба и Огава, на следующем этапе работы нами проведено выделение иммуноглобулинов из сыворотки иммунизированных кроликов. Необходимо отметить наличие перекрестных реакций с гетерологичными антигенами (табл. 3), однако концентрация антигена составляла 200 ± 20 мкг/мл при использовании лошадиных иммуноглобулинов.

Высокую степень корреляции с методом РНГА и непрямым ДИА с коллоидным золотом показали кроличьи иммуноглобулины к О-АГ Огава.

Таблица 2. Определение активных компонентов вакцины, ДИА с конъюгатом на основе лошадиных иммуноглобулинов (обратный титр)

	Образец	Ig к О-АГ Огава, лошадиный	Ig к О-АГ Инаба, лошадиный	Непрямой ДИА*КЗ	РНГА
О-АГ Огава	1	80	20	1024	3584
	2	0	0	320	448
	3	20	0	640	4778
	4	320	20	512	128
	5	20	0	1024	4069
	6	80	0	640	4096
	7	20	640	1024	2730
О-АГ Инаба	8	10	320	640	2048
	9	0	80	320	853
	10	40	320	1024	3584
Корреляция с результатами непрямого ДИА*КЗ		<b>0,12</b>	<b>0,81</b>		
Корреляция с результатами РНГА		<b>0,54</b>	<b>0,61</b>		

Таблица 3. Определение активных компонентов вакцины, ДИА с конъюгатом на основе кроличьих иммуноглобулинов (обратный титр)

	Образец	Ig к О-АГ Огава, кроличий	Ig к О-АГ Инаба, кроличий	Непрямой ДИА*КЗ	РНГА
О-АГ Огава	1	1280	40	1024	3584
	2	320	0	320	448
	3	640	10	640	4778
	4	320	20	512	128
	5	1024	0	1024	4069
	6	640	20	640	4096
	7	10	40	1024	2730
О-АГ Инаба	8	10	20	640	2048
	9	0	0	320	853
	10	20	1280	1024	3584
Корреляция с результатами непрямого ДИА*КЗ		<b>0,95</b>	<b>0,46</b>		
Корреляция с результатами РНГА		<b>0,66</b>	<b>0,35</b>		

## Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования показана возможность применения прямого дот-иммуноанализа для определения О-АГ сероваров Инаба и Огава. Алгоритм постановки с использованием иммуноглобулинов, меченных коллоидным золотом, позволяет усилить специфичность и чувствительность анализа, а также уменьшить время анализа. На основе полученных результатов предложен алгоритм определения специфической активности О-АГ, который складывается из количественного и качественного анализа. Количественный анализ содержания О-АГ в специфических фракциях и готовой холерной химической вакцине возможен непрямой метод ДИА с коммерческой О1 сывороткой и с использованием конъюгата на основе белка А, меченного коллоидным золотом. Определение качественного состава О-АГ по сероварной принадлежности осуществимо прямым вариантом ДИА, в основе которого лежит получение конъюгатов IgG, выделенных из специфических холерных сывороток иммунизированных животных, с коллоидным золотом. В дальнейшем данный подход к постановке прямого варианта ДИА может быть использован для разработки алгоритма качественного определения содержания О-антигенов разной сероварной специфичности в готовой лекарственной форме, а также при оценке стабильности О-АГ, входящих в ее состав.

## Литература

1. Беспалова ИА, Иванова ИА, Омельченко НД, Филиппенко АВ, Труфанова АА. Современное состояние специфической профилактики холеры. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018;1(98):55-61.
2. Кутырев ВВ, Девдариани ЗЛ, Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;92(2):18-24.
3. Онищенко ГГ, Попова АЮ, Кутырев ВВ, Смирнова НИ, ЩербакOVA СА, Москвитина ЭА. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. 2016; 1:89-101.
4. Гаева АВ, Громова ОВ, Дуракова ОС, Генералов СВ, Волох ОА. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018;22(1):152-7.
5. Терешкина НЕ, Терехова ИВ, Сырова НА, Девдариани ЗЛ, Ляшова ОЮ, Григорьева ГВ, и др. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремийного микроба «ДИАТул-М». Проблемы особо опасных инфекций. 2013;2:42-5.
6. Абрамова ЕГ. Разработка биотехнологической схемы получения флуоресцирующих иммуноглобулинов для идентификации холерных вибрионов О139 серогруппы. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 2005.
7. Коробов АИ, Гламаздин ИГ. Разработка диагностической тест-системы на основе дот-ИФА при фасциозе крупного рогатого скота. Российский паразитологический журнал. 2010;3:88-92.
8. Загоскина ТЮ, Балахонов СВ, Марков ЕЮ, Николаев ВБ, Субычева ЕН, Чапоргина ЕА, и др. Апробация диагностических тест-систем с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител для скрининга исследуемого материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина в дот-иммуноанализе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014;4(77):61-4.

9. Полтавченко АГ. Иммунизация антигенов на подложке белкового чипа. Биотехнология. 2007;1:86-94.
10. Liang RQ. Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. J Immunol Methods. 2004 Feb 15;285(2):157-63. DOI: 10.1016/j.jim.2003.11.008
11. Полтавченко АГ, Ерш АВ, Крупницкая ЮА. Выбор системы детекции для мультиспектрного дот-иммуноанализа антител. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(4):229-33. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233
12. Дыкман ЛА, Хлебцов НГ. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. Acta Naturae. 2011;3(2):36-58.
13. Комиссаров АВ, Еремин СА, Задохин СН, Шульгина ИВ, Лобовикова ОА, Ливанова ЛФ, Никифоров АК. Новые подходы в технологии получения таблетки вакцины холерной бивалентной химической. Биофармацевтический журнал. 2015;7(1):30-9.
14. Rane L, Newhouser LR. A method for the separation of protein fractions. U.S. Armed Forces Med. 1954;5:368-71.
15. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol Reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.
16. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. Nature Physical Science. 1973;241(105):20-2.
17. Жигмонди Р. Коллоидная химия. Харьков, Киев: Изд. НК Снаба УССР; 1933, 452 с.
18. Воробьева СА, Дуракова ОС, Волох ОА, Громова ОВ. Возможность определения специфической активности О-Аг в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2018;18(3):318-9. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319
19. Дуракова ОС, Громова ОВ, Киреев МН, Воробьева СА, Клокова ОД, Ливанова ЛФ, Белякова НИ, Волох ОА. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2018; 14(4):10-3.
20. Государственная фармакопея Российской Федерации. МЗ РФ. XIII. Изд. Москва. 2015; 3:1294 с.

## References

1. Bepalova IA, Ivanova IA, Omelchenko ND, Filippenko AV, Trufanova AA. Current State of Cholera Specific Prophylaxis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018;1(98):55-61. (In Russian).
2. Kutyrev VV, Devdariani ZL, Sayapina LV. Present Status of the Researches in the Sphere of Vaccine Prophylaxis of Particularly Dangerous Bacterial Infections. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2006;92(2):18-24. (In Russian).
3. Onischenko GG, Popova AY, Kutyrev VV, Smirnova NI, Scherbakova SA, Moskvitina EA, Titova SV. Actual problems of epidemiologic control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in Russian Federation. Journal of microbiology epidemiology immunobiology. 2016;1(1):89-101. 2016;1:89-101. (In Russian).
4. Gaeva AV, Gromova OV, Durakov OS, Generalov SV, Volokh OA. Modern approaches to the control of active components of cholera chemical vaccine. Prazbotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2018;22(1):152-7. (In Russian).
5. Tereshkina NE, Terekhova IV, Syrova NA, Devdariani ZL, Lyashova OYu, Grigor'eva GV, et al. Constructing and Medical Trials of a Monoclonal Dot-Immuno-Enzyme Test-System "DIATul-M" for Tularemia Microbe Detection. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2013;2:42-5. (In Russian).
6. Abramova EG. Razrabotka biotekhnologicheskoi skhemy polucheniya fluores-tsiryushchikh immunoglobulinov dlya identifikatsii kholernykh vibriinov O139 serogruppy. Diss. Saratov, 2005. (In Russian).

7. Korobov AI, Glamazdin IG. Elaboration of diagnostic test-system on the basis of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) at cattle fasciolosis. Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal. 2010;3:88-92. (In Russian).
8. Zagorskina TYu, Balakhonov SV, Markov EYu, Nikolaev VB, Subycheva EN, Chaporgina EA, et al. Approbation of Diagnose Test-Systems with Use of Silver Nano-Partides as Markers of Spedifid Antibodies for Sdreening of the Investigated Material for Presende of Antigens of Plague, Brucellosis, Tularemia Causative Agents and Botulotoxin in Dot-Immunoassay. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2014;4(77):61-4. (In Russian).
9. Poltavchenko AG. Immobilizatsiya antigenov na podlozhke belkovogo chipa. Biotekhnologiya. 2007;1:86-94. (In Russian).
10. Liang RQ. Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silwer enhancement. J Immunol Methods. 2004 Feb 15;285(2):157-63. DOI: 10.1016/j.jim.2003.11.008
11. Poltavchenko AG, Ersh AV, Krupnitskaya YuA. The selection of system of detection for multiplex dot-immune analysis of antibodies. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(4):229-33. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233 (In Russian).
12. Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. Acta Naturae. 2011;3(2):36-58. (In Russian).
13. Komissarov AV, Eremin SA, Zadokhin SN, Shulgina IV, Lobovikova OA, Livanova LF, Nikiforov AK. New approaches in technology of manufacturing of the tablet of cholera chemical bivalent vaccine. Russian Journal of Biopharmaceuticals. 2015;7(1):30-9. (In Russian).
14. Rane L, Newhouser LR. A method for the separation of protein fractions. U.S. Armed Forces Med. 1954;5:368-71.
15. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol Reagent. J Biol Chtm. 1951;193:265-75.
16. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Mono-disperse Gold Suspensions. Nature Physical Science. 1973;241(105):20-2.
17. Zhigmondi R. Kolloidnaya khimiya [Colloid chemistry]. Khar'kov, Kiev, 1933, 452 p. (In Russian).
18. Vorobyova SA, Durakova OS, Volokh OA, Gromova OV. Possibility of Determination of Specific Activity of O-Ag in the Production of Cholera Chemical Vaccine by Dot-Analysis. Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology. 2018;18(3):318-9. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319 (In Russian).
19. Durakova OS, Gromova OV, Kireev MN, Vorob'eva SA, Klokova OD, Livanova LF, Belyakova NI, Volokh OA. Primenenie dot-immunoanaliza dlya opredeleniya spetsificheskoi aktivnosti antigenov v proizvodstve kholernoii vaksiny. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoi biologii. 2018;14(4):10-3. (In Russian).
20. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. Moscow. 2015; 3:1294 p. (In Russian).

#### Информация об авторах:

Дуракова Оксана Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора  
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46  
Телефон: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора  
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46  
Телефон: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Киреев Михаил Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора  
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46  
Телефон: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора  
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46  
Телефон: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Клокова Ольга Дмитриевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора  
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46  
Телефон: (8452)262131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Information about authors:

Oksana S. Durakova, junior researcher, laboratory of cholera vaccine Russian Research Anti plague Institute «Microbe»  
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation  
Phone: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Oksana A. Volokh, PhD (Biology), head of the department of preventive drugs, Russian Research Anti plague Institute «Microbe»  
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation  
Phone: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Michael N. Kireev, MD, PhD, leading researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti plague Institute «Microbe»  
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation  
Phone: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Olga V. Gromova, MD, PhD, senior researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti plague Institute «Microbe»  
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation  
Phone: (8452) 26-2131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Olga D. Klokova, MD, PhD, senior researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti plague Institute "Microbe"  
Address: 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation  
Phone: (8452)262131  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

## НОВЫЕ КНИГИ



**Туляремия: состояние проблемы и методы исследования [Текст] / А.Н.Мокриевич [и др.]; под ред. И.А.Дятлова. – Оболенск: [б. и.], 2019. – 263 с.: цв. ил. – Библиогр.: с. 247–263. ISBN 978-5-98125-107-8 (в пер.)**

В коллективной монографии на основании многолетних собственных исследований авторов и сведений литературы изложены методы оценки биологических свойств возбудителя туляремии. Подробно освещены методы изучения культурально-морфологических, биологических, биохимических, молекулярно-генетических свойств возбудителя, методические приемы работ с диагностическими системами, клеточными культурами и экспериментальными животными, методы поддержания, хранения, приготовления культур возбудителя, а также правила обеспечения безопасности работ с возбудителем туляремии. Монография может быть использована практическими работниками медицинского и ветеринарного профилей, научными сотрудниками, преподавателями, аспирантами и студентами при изучении и оценке биологических свойств возбудителя туляремии.

# Совет молодых ученых Ростовского-на-Дону противочумного института: яркие моменты из прошлого, современный период и взгляд в будущее

О.Ф.Кретенчук, Д.А.Левченко, И.А.Щипелева, А.К.Носков

*Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

В статье представлен краткий исторический очерк о Совете молодых ученых Ростовского-на-Дону противочумного института. Названы председатели и активные молодые ученые разных лет. Изложены возможные перспективы дальнейшего развития Совета.

*Ключевые слова:* Совет молодых ученых, традиции, история становления, конференция

**Для цитирования:** Кретенчук О.Ф., Левченко Д.А., Щипелева И.А., Носков А.К. Совет молодых ученых Ростовского-на-Дону противочумного института: яркие моменты из прошлого, современный период и взгляд в будущее. Бактериология. 2019; 4(4): 55–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-55-60

## The council of young scientists of the Rostov-on-Don Antiplague institute: bright moments from the past, our present and prospect

O.F.Kretenchuk, D.A.Levchenko, I.A.Shchipeleva, A.K.Noskov

*Rostov-on-Don Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation*

The article presents a brief historical outline of the Council of Young Scientists (CMY) of the Rostov-on-Don Antiplague institute. The article also presents the information about the chairmen and active young scientists of different years. Possibilities for the future of CMY's development are proposed.

*Keywords:* Council of young scientists, traditions, history, conference

**For citation:** Kretenchuk O.F., Levchenko D.A., Shchipeleva I.A., Noskov A.K. The council of young scientists of the Rostov-on-Don Antiplague institute: bright moments from the past, our present and prospect. Bacteriology. 2019; 4(4): 55–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-55-60

Советы молодых ученых (СМУ) имеют длительную историю, которую условно можно разделить на два этапа – советский и современный. Современный СМУ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора является наследником традиций СМУ, организованного в нашем институте еще в семидесятых годах XX века, занимающих особое место в развитии науки. Именно в это время начался экспоненциальный рост многих научных направлений [1]. Председателями СМУ Ростовского-на-Дону противочумного института в разное время являлись Б.Н.Мишанькин, С.А.Лебедева, Т.А.Кудря-

кова, А.Н.Терентьев, А.Л.Трухачев, И.А.Иванова, В.В.Агафонова, О.С.Чемисова, О.А.Цырулина (рис. 1). В настоящее время СМУ возглавляет старший научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры, кандидат медицинских наук Д.А.Левченко [2].

Первая конференция молодых ученых противочумной системы состоялась в 1977 г. в г. Волгограде. Ростовский-на-Дону противочумный институт представлял председатель СМУ Б.Н.Мишанькин. Результаты научных работ молодые ученые докладывали не только на ежегодных конференциях, но и на различных семинарах, симпозиу-

### Для корреспонденции:

Кретенчук Оксана Федоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научного отдела ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-9124  
E-mail: oksidjinf@mail.ru

Статья поступила 25.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Oksana F. Kretenchuk, PhD (Biology), senior research fellow at the science department, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M. Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-9124  
E-mail: oksidjinf@mail.ru

The article was received 25.11.2019, accepted for publication 20.12.2019





Рис. 1. Председатели СМУ института.

мах. Так, в г. Ростове-на-Дону проходил симпозиум, посвященный экологии холерного вибриона. В президиуме находился заместитель министра здравоохранения СССР П.Н.Бургасов, от СМУ Ростовского-на-Дону противочумного института выступал старший научный сотрудник Ю.И.Арутюнов.

Значимым научным событием прошлых лет было проведение на базе нашего института Всесоюзной конференции молодых ученых по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций (15–17 февраля 1984 г.). Предпосылками данного мероприятия было развитие в институте под руководством директора И.В.Домарадского (1964–1973 гг.) фундаментальных исследований по биохимии, генетике и молекулярной биологии возбудителей особо опасных инфекций и принятие ЦК КПСС и Советом Министров СССР постановления № 304 от 19.04.1974 «О мерах по ускоренному развитию молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве» [3]. В конференции участвовало 243 человека, из них 110 – молодые ученые и специалисты из 31 учреждения системы здравоохранения и АН СССР. Для обсуждения было представлено более 80 обзорных и оригинальных докладов и стендовых сообщений, в том числе и сотрудников Ростовского-на-Дону противочумного института: С.А.Лебедевой, А.Н.Терентьева, С.О.Водопьянова, В.М.Сорокина, Н.В.Павлович и др. [4–8].

Наши участники Всесоюзной конференции 1984 г. продолжают трудиться в институте и в настоящее время, передавая свой опыт младшему поколению. Так, С.А.Лебедева, долгие годы работавшая руководителем лаборатории, активно разрабатывала направление генетических исследований чумного микроба [9–11], за что была награждена медалью «За трудовую доблесть». В 1993 г. защитила докторскую диссертацию «Гетерологичные плазмиды и фаги в анализе генома чумного микроба». Под ее руководством шестеро молодых ученых защитили кандидатские диссертации. А.Н.Терентьев, продолжив исследования, представленные на Всесоюзной конференции 1984 г., защитил сначала кандидатскую, а затем и докторскую диссертацию. Под его руководством в лаборатории диагностики особо опасных инфекций (ООИ) разрабатывались отечественные препараты на основе полимерных микросфер [12], по одному из них была защищена кандидатская диссертация молодого ученого Е.А.Березняка (конструирование антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума). С.О.Водопьянов продолжил работу по изучению пилеобразования иерсиний и в 1995 г. защитил докторскую диссертацию. С 2008 г. руководит лабораторией биохимии микробов, основным направлением которой на сегодняшний день является использование приемов молекулярной биологии и информационных технологий при изучении возбудителей ООИ. Материалы исследований В.М.Сорокина по сравнительному



Рис. 2. Участники конкурса лаборантов «Золотые руки» (г. Алма-Ата).

анализу фаговых ДНК методом электронно-микроскопического гетеродуплексного анализа [13] были доложены не только на Всесоюзной конференции 1984 г., но и на семинаре для сотрудников противочумной системы по электронной микроскопии нуклеиновых кислот, проведенном на базе нашего института под эгидой Минздрава СССР и с участием ведущих специалистов из московских НИИ. В настоящее время под руководством В.М.Сорокина осуществляются исследования, направленные на изучение возможности генотипирования *Helicobacter pylori* по INDEL-маркерам, генотипирование клинических изолятов *H. pylori* по генам вирулентности и создание унифицированной базы данных генотипов *H. pylori* [14]. Н.В.Павлович продолжила исследования по изучению возбудителя туляремии и в 1993 г. защитила докторскую диссертацию на тему «Биологические свойства и факторы патогенности *Francisella tularensis*». В течение многих лет руководит лабораторией туляремии, основными научными направлениями которой являются изучение роли липополисахаридов в патогенезе и иммуногенезе туляремийной инфекции [15]; изучение признаков, отличающих представителей различных подвидов, и создание новых методов подвижной дифференциации штаммов. Большая работа проводится по исследованию механизмов формирования у туляремийного микроба устойчивости к антибиотикам и поиску путей их преодоления [16]. Под руководством Н.В.Павлович четверо молодых ученых защитили кандидатские диссертации.

Помимо привычных для всех конференций и семинаров, молодые ученые проводили различные конкурсы. Так, был проведен конкурс лаборантов на базе Казахского научно-исследовательского института в Алма-Ате «Золотые руки», победителем которого стала О.С.Бурлакова, в настоящее

время возглавляющая отдел профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Многие активные деятели СМУ не только защитили докторские диссертации, получили ученые звания, но и стали директорами институтов (академики РАН В.В.Кутырев и И.А.Дятлов, некоторые сотрудники нашего института).

Кроме научной деятельности, большое внимание молодые ученые уделяли культурным мероприятиям (новогодние огоньки, день медицинского работника, спортивные соревнования и физкультурные паузы, турниры по шахматам и т.д.), о чем можно узнать из архивных материалов института, прекрасных фотоальбомов. Традиция художественного творчества детей сотрудников института продолжается и в наше время: дети молодых ученых активно принимают участие в ежегодном конкурсе новогодней игрушки. На базе института существовал вокально-инструментальный ансамбль, на концертах которого не было свободных мест. В советский период на СМУ возлагались и функции по коммунистическому воспитанию молодых ученых, повышению их общественно-политической и трудовой активности, роли в строительстве коммунистического общества. Молодые ученые активно занимались изготовлением различных фотостендов, распространяли плакаты и даже не могли представить, какие возможности даст человечеству компьютер или обычный мобильный телефон, поддерживающий невообразимые для того времени функции. На смену стендам пришли постеры, созданные в различных графических редакторах и программах, а печатные издания сборников конференций уступают место электронным вариантам. Конечно, электронные страницы – это хорошо, легче и удобнее хранить большое

количество информации, но в нашем институте традиционный вариант печатных изданий остается в приоритете. Молодые ученые являются авторами многих работ, представленных в ежегодных сборниках по проблеме «Холера», и принимают участие в их рассылке не только в противочумные институты и станции, но и в библиотеки (Центральная медицинская библиотека, Донская государственная публичная библиотека и другие).

Ежегодно весной с момента создания Совета в институте проводился конкурс работ молодых ученых, способствующий развитию навыка публичных выступлений перед научной аудиторией, умения высказать и защитить свою точку зрения, а также продемонстрировать владение структурно-содержательным и лексико-грамматическим оформлением доклада. Победителей поздравляли на заседании ученого совета. В 1990-е годы снизилась активность деятельности Совета в этом направлении, а за последние несколько лет произошел приток молодежи в связи с поддержкой и активизацией участия молодых ученых и специалистов в инновационной деятельности (Указ Президента Российской Федерации от 18.06.2015 № 312 «О премии Президента Российской Федерации в области науки и инноваций для молодых ученых»). С 2018 г. на базе Ростовского-на-Дону противочумного института организован ежегодный конкурс «Лучшая работа молодого ученого», направленный на выявление новых идей в области эпидемиологии, микробиологии и генетики и на поддержку молодых специалистов. В состав конкурсной комиссии вошли члены ученого совета, доктора и кандидаты наук, являющиеся высококвалифицированными специалистами в различных областях науки. За два года в конкурсе приняли участие более 20 специалистов различных подразделений института с докладами о результатах своих исследований. Победителями конкурса в 2018 г. были признаны: младший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ Головин С.Н. за доклад «Трансмиссионная электронная микроскопия биопленок *Vibrio cholerae* на хитине» (1-е место); младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы Кузнецова Д.А. за доклад «Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*» (2-е место); младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы Мелоян М.Г. за доклад «Внутривидовое генотипирование штаммов *Y. pestis* с помощью мобильных генетических элементов методом ПЦР» (3-е место). Победителями конкурса в 2019 г. стали молодые ученые: научный сотрудник МЖК с ЦПВ Полеева М.В. (доклад «Экспериментальное изучение особенностей формирования парагемолитическими вибрионами биопленки на поверхностях биотических объектов», 1-е место); младший научный сотрудник лаборатории диагностики ООИ Сорокин Р.А. (доклад «Оценка жизнеспособности *V. cholerae* с помощью молекулярно-биологических методов», 2-е место); младший научный сотрудник отдела профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов Гудуева Е.Н. (доклад «Молекулярно-генетические методы типирования *Helicobacter pylori*», 3-е место). Победителям конкурса была

предоставлена возможность участвовать во Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (X и XI). В рамках работы конференций на базе других институтов выбраны лучшие работы молодых ученых, среди которых оказались и работы победителей конкурса, проводимого в нашем институте (Головин С.Н., Кузнецова Д.А., Полеева М.В.). Молодые ученые института являются постоянными участниками и неоднократными победителями различных конкурсов, проектов, конференций, семинаров, в том числе с международным участием.

В 2020 г. СМУ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора продолжит свою деятельность, не только перенимая бесценный опыт старшего поколения, но и проводя поиск новых интересных идей. В 2020 г. на базе института планируется проведение XII Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» с ежегодным заседанием Совета молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Для оценки готовности молодых ученых к проведению данного мероприятия СМУ планирует предварительный открытый конкурс, результаты которого позволят выявить наиболее интересные доклады.

Профессиональное становление ученого – процесс непростой. Необходимы такие проекты, которые требуют совместных действий и которые проще осуществить под эгидой молодых ученых. Например, воспользоваться форматом пространства коллективной работы «Точка кипения», в котором каждый человек или команда получают возможность обмена опытом, свободный доступ к знаниям, новым идеям, технологиям. Также СМУ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора планирует вступить в СМУиС Ростовской области VI созыва, целями которого являются информационно-консультативное содействие, популяризация новейших достижений молодых ученых Ростовской области, разработка предложений и мер по стимулированию деятельности молодых ученых и специалистов области, созданию условий для их профессионального роста и повышения социальной активности [17].

Таким образом, для расширения и развития деятельности СМУ молодые ученые должны, опираясь на опыт прошлого, проводить поиск новых форм деятельности, использовать СМУ как дискуссионную и инновационную площадку для распространения и внедрения результатов своих научных исследований.

## Литература

1. Бунин ВД. История развития одного научного направления. Бактериология. 2019;4(1):68-72. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-68-72
2. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт – 85 лет. Ростов-на-Дону: ОО «Мини Тайп»; 2019, 368 с.
3. Поправко НВ. Как все начиналось. Воспоминания ветерана. Бактериология. 2019;4(1):64-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-64-67
4. Стыченко ТМ, Лебедева СА. Чувствительность к УФ-лучам некоторых штаммов возбудителя чумы. Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и

- иммунологии возбудителей особо опасных инфекций. Ростов-на-Дону, 1984, с. 61-63.
5. Кадетов ВВ, Терентьев АН. Некоторые биомолекулярные аспекты сохранения жизнеспособности микроорганизмов в процессе лиофилизации. Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций. Ростов-на-Дону, 1984, с. 169-75.
6. Водопьянов СО, Родионова АВ. Пилеобразование у иерсиний. Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций. Ростов-на-Дону, 1984, с. 8-10.
7. Сорокин ВМ, Кравцов АН. Применение методов электронной микроскопии для изучения нуклеиновых кислот. Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций. Ростов-на-Дону, 1984, с. 56-61.
8. Павлович НВ, Ткачева НВ. Отношение сферопластов туляремийного микроба к пенициллину. Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций. Ростов-на-Дону, 1984, с. 46-47.
9. Лебедева СА, Гребцова НН, Чернявская АС, Кузнецова ЛС, Васильева ЕА. Влияние плазмид чумного микроба на летальность и иммуногенность. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1991;3:5-10.
10. Трухачев АЛ, Лебедева СА. Способы диагностики и дифференциации возбудителя чумы: детекция атипичных штаммов *Yersinia pestis* молекулярно-биологическими методами. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2006;1:3-6.
11. Лебедева СА, Трухачев АЛ, Иванова ВС, Арутюнов ЮИ, Божко НВ, и др. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики. Ростов-на-Дону, 2009, 534 с.
12. Симакова ДИ, Карбышев ГЛ, Ларионова ЛВ, Терентьев АН, Лысова ЛК и др. Псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный диагностикум. Принципы конструирования и результаты испытаний. Биотехнология. 2011;3:88-95.
13. Кравцов АН, Сорокин ВМ, Новосельцев НН, Марченков ВИ. Электронно-микроскопическое изучение ДНК фагов Д'Эрелля, РД-2 и РД-1. Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции по актуальным вопросам молекулярной биологии, генетики и иммунологии возбудителей особо опасных инфекций. Ростов-на-Дону, 1984; с. 37-8.
14. Sorokin VM, Pisanov RV, Vodop'janov AS. Improvement of Multiple-Locus VNTR Analysis Typing Scheme for *Helicobacter pylori*. Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. 2018;1(4):1-7.
15. Оноприенко НН, Павлович НВ. Взаимодействие S- и R-липополисахаридов *Francisella tularensis* с липополисахаридсвязывающим белком сыворотки крови человека. Журнал микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. 2008;4:16-20.
16. Павлович НВ, Цимбалистова МВ. Повышение антибактериальной активности цефалоспоринов в отношении *Francisella tularensis*. Антибиотики и химиотерапия. 2019;64(7-8):32-6. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100037
17. Официальный портал Правительства Ростовской области. Доступно по: <https://www.donland.ru/commission/29/>
3. Popravko NV. How it all began. Veteran memories. Bacteriology. 2019;4(1):64-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-64-67 (In Russian).
4. Styt'senko TM, Lebedeva SA. Sensitivity to UV rays of some strains of the plague pathogen. Abstracts of reports of the all-Union Scientific Conference on Topical Issues of Molecular Biology, Genetics and Immunology of Pathogens of Particularly Dangerous Infections. Rostov-on-Don, 1984, pp. 61-63. (In Russian).
5. Kadetov VV, Terent'ev AN. Some biomolecular aspects of preserving the viability of microorganisms in the freeze-drying process. Abstracts of reports of the all-Union Scientific Conference on Topical Issues of Molecular Biology, Genetics and Immunology of Pathogens of Particularly Dangerous Infections. Rostov-on-Don, 1984, pp. 169-75. (In Russian).
6. Vodop'yanov SO, Rodionova AV. Pileobrazovanie u iersinii. Abstracts of reports of the all-Union Scientific Conference on Topical Issues of Molecular Biology, Genetics and Immunology of Pathogens of Particularly Dangerous Infections. Rostov-on-Don, 1984, pp. 8-10. (In Russian).
7. Sorokin VM, Kravtsov AN. Application of electron microscopy methods for the study of nucleic acids. Abstracts of reports of the all-Union Scientific Conference on Topical Issues of Molecular Biology, Genetics and Immunology of Pathogens of Particularly Dangerous Infections. Rostov-on-Don, 1984, pp. 56-61. (In Russian).
8. Pavlovich NV, Tkacheva NV. Ratio of spheroplasts tularemia microbe to penicillin. Abstracts of reports of the all-Union Scientific Conference on Topical Issues of Molecular Biology, Genetics and Immunology of Pathogens of Particularly Dangerous Infections. Rostov-on-Don, 1984, с. 46-47. (In Russian).
9. Lebedeva SA, Grebtsova NN, Chernyavskaya AS, Kuznetsova LS, Vasil'eva EA. Vliyanie plazmid chumnogo mikroba na letal'nost' i immunogenost'. Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya). 1991;3:5-10. (In Russian).
10. Trukhachev AL, Lebedeva SA. Methods of diagnosis and differentiation of plague pathogen: approaches to detection of atypical strains of *Yersinia Pestis* by molecular biology. Part I. Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya). 2006;1: 3-6. (In Russian).
11. Lebedeva SA, Trukhachev AL, Ivanova VS, Arutyunov Yul, Bozhko NV, et al. Variabel'nost' vzbuditelya chумы i problemy ego diagnostiki. Rostov-on-Don, 2009, 534 p. (In Russian).
12. Simakova DI, Karbyshev GL, Larionova LV, Terentiev AN, Lysova LK, et al. A Pseudotuberculosis Species-Specific Antigenic Polymeric Diagnostic Preparation. Principles of Designing and Results of Testing. Biotechnology in Russia. 2011;3:80-8. (In Russian).
13. Kravtsov AN, Sorokin VM, Novosel'tsev NN, Marchenkov VI. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie DNK fagov D'Erellya, RD-2 i RD-1. Abstracts of reports of the all-Union Scientific Conference on Topical Issues of Molecular Biology, Genetics and Immunology of Pathogens of Particularly Dangerous Infections. Rostov-on-Don, 1984; pp. 37-8. (In Russian).
14. Sorokin VM, Pisanov RV, Vodop'janov AS. Improvement of Multiple-Locus VNTR Analysis Typing Scheme for *Helicobacter pylori*. Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. 2018;1(4):1-7.
15. Оноприенко НН, Павлович НВ. Interaction of S- and R-lypopoly-saccharides of *Francisella tularensis* with lypopolysaccharide-binding protein of human serum. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2008;4:16-20. (In Russian).
16. Pavlovich NV, Tsymbalistova MV. Increased Antibacterial Activity of Cephalosporins against *Francisella tularensis*. Antibiotics and Chemotherapy. 2019;64(7-8):32-6. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100037 (In Russian).
17. Official portal of the government of the Rostov region. Available at: <https://www.donland.ru/commission/29/> (In Russian).

## References

1. Bunin VD. History of one scientific direction development. Bacteriology. 2019;4(1):68-72. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-68-72 (In Russian).
2. Rostov-on-Don Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor – 85 years. Rostov-on-Don: "Mini Taip" Publ.; 2019, 368 p. (In Russian).

#### Информация об авторах:

Левченко Дарья Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-9124

Щипелева Ирина Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научного отдела, ученый секретарь, врио начальника научного отдела ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-9122

Носков Алексей Кимович, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-2703

#### Information about authors:

Daria A. Levchenko, MD, PhD, senior research fellow at the laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Antiplaque Research Institute of Rospotrebnadzor  
Address: 117/40 M. Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-9124

Irina A. Shchipeleva, PhD (Biological Sciences), leading research fellow at the science department, scientific secretary, interim the head of the science department, Rostov-on-Don Antiplaque Research Institute of Rospotrebnadzor  
Address: 117/40 M. Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-9124

Alexey K. Noskov, MD, PhD, director Rostov-on-Don Antiplaque Research Institute of Rospotrebnadzor  
Address: 117/40 M. Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-2703

## НОВОСТИ НАУКИ

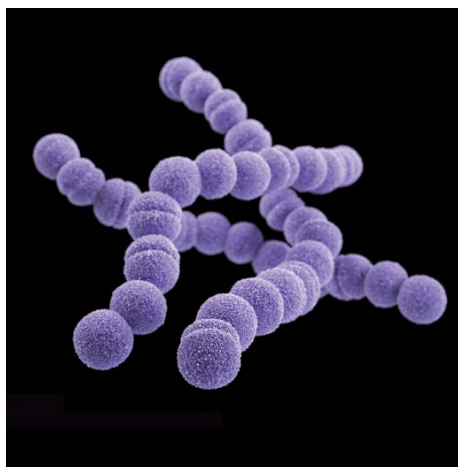
### *Campylobacter* и *Salmonella* у животных и их вклад в болезни человека

Мясо скота и субпродукты вносят значительный вклад в питание человека как источники высококачественного белка и микроэлементов. Продукты животноводства становятся все более востребованными, особенно в странах с низким и средним уровнем дохода, где экономика растет, а мясо все чаще рассматривается как доступный и желательный продукт питания. Спрос также способствует интенсификации животноводства и переработки. Непреднамеренным следствием интенсификации является повышенное воздействие зоонозных агентов, а современной возникающей проблемой является заражение *Campylobacter* и *Salmonella* spp. от домашнего скота (птиц и млекопитающих), что может привести к болезням, нарушению всасывания и недоеданию через острую и хроническую диарею. Это может произойти на ферме, в домашних хозяйствах или через пищевую цепь. Прямая инфекция возникает при обращении со скотом и через бактерии, попадающие в окружающую среду, на поверхности для приготовления пищи или вокруг дома и окрестностей. В этой рукописи содержится критический обзор инфекций *Campylobacter* и *Salmonella* у животных, анализируются факторы, влияющие на колонизацию и выделение фекалий бактерий этих двух родов, а также факторы риска заражения человека инфекцией от инфицированных животных или окружающей среды и анализируются приоритетные области для профилактических действий с сосредоточиться на ресурсных настройках.

Rukambile E. et al.

*Infection, colonization and shedding of Campylobacter and Salmonella in animals and their contribution to human disease: A review Zoonoses and Public Health. 2019.*

### Поиски вакцины против стрептококков группы А сузились



Поиск глобальной вакцины против стрептококка сузился после того, как исследователи секвенировали ДНК более 2000 образцов стрептококков группы А, собранных со всего мира. Исследователи выявили различия между штаммами из более чем 20 стран и определили потенциальные цели для вакцинации, присутствующие в большинстве штаммов.

Бактерии *Streptococcus* группы А, широко известные как Strep А, являются одной из 10 основных причин смерти от инфекционных заболеваний во всем мире. По оценкам, ежегодно они приводят к гибели более полумиллиона человек, главным образом в регионах с низким уровнем дохода. Пока нет эффективной вакцины для Стреп А, и поиск вакцины затруднен разнообразием штаммов Стреп А. До сих пор большая часть информации поступала из районов с высоким уровнем дохода, таких как Великобритания и США, однако очень мало известно о стрептококке А в регионах с низким уровнем дохода, где он вызывает наибольшее количество проблем. Это означает, что нынешние кандидаты на вакцины могут быть неэффективными во всех области.

*Group A Streptococcus vaccine search narrowed – Outbreak News Today [Electronic resource].*

*URL: <http://outbreaknewstoday.com/group-a-streptococcus-vaccine-search-narrowed-53134/> (accessed: 14.12.2019).*

# Этапы развития производства питательных сред в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии

Л.В.Домотенко, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин

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

Приведен краткий научно-исторический очерк создания в ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора одного из крупнейших производств бактериологических питательных сред. Описаны основные достижения сотрудников в области разработки и организации производства питательных сред. Показаны различные аспекты научно-практической и научно-образовательной деятельности отдела питательных сред.

*Ключевые слова:* питательные среды, производство питательных сред

**Для цитирования:** Домотенко Л.В., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Этапы развития производства питательных сред в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии. Бактериология. 2019; 4(4): 61–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-61-67

## Stages of development of nutrient media production at the State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

L.V.Domotenko, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin

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

There is a brief scientific and historical essay on establishing the FBIS SRCAMB of Rosпотребнадзор, one of the largest manufacturers of bacteriological nutrient media. The main advances of the staff in developing and organizing the nutrient medium production are described. Various aspects of scientific-practical and -educational activities of the Department of nutrient media are shown.

*Keywords:* nutrient media, production of nutrient media

**For citation:** Domotenko L.V., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Stages of development of nutrient media production at the State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Bacteriology. 2019; 4(4): 61–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-61-67

**П**итательные среды по праву можно назвать основой микробиологии. Они используются в диагностике инфекционных заболеваний и при эпидемиологическом контроле за санитарным состоянием окружающей среды, в производстве вакцинных и биологически активных препаратов, при выборе рациональной антибиотикотерапии и контроле за качеством лечения, при определении микробной загрязненности лекарственных препаратов и проведении лабораторных исследований с музейными и свежевыделенными штаммами микроорганизмов.

Гарантией получения достоверных результатов микробиологических исследований является использование питательных сред стабильно высокого качества, которое может быть достигнуто при промышленном производстве, где в основе коммерческих разработок лежат научные разработки, где налажен процесс контроля качества, в процессе которого тщательно проверяется качество сырья и конечного продукта.

Именно такой подход к разработкам и производству питательных сред применяется более 40 лет в ГНЦ ПМБ, где организовано одно из самых крупных производств питатель-

### Для корреспонденции:

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

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 26.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

### For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemistry), leading researcher of the laboratory of culture media of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 26.11.2019, accepted for publication 20.12.2019



Фото 1. Артюхин Виктор Иванович, кандидат химических наук, первый руководитель лаборатории питательных сред.

ных сред в РФ как в сухом, так и в готовом к применению виде. Под руководством одного из основателей этого направления, доктора биологических наук Шепелина А.П., в настоящее время производятся питательные среды для клинической, санитарной и фармацевтической микробиологии в объеме, обеспечивающем проведение более 100 млн микробиологических исследований.

А начиналось все в далеком 1977 г.: во вновь созданном ВНИИ прикладной микробиологии была создана лаборатория питательных сред – лаборатория № 13. Первым руководителем лаборатории (в то время начальником лаборатории)

был кандидат химических наук Виктор Иванович Артюхин (фото 1). Высококласный специалист-химик, он с энтузиазмом принялся за новое для него направление деятельности и начал организовывать работу по созданию питательных сред, применяя научно-ориентированный подход. «Главное, – говорил Виктор Иванович, – надо понимать механизмы процессов получения питательных сред на всех этапах, включая получение различных белковых гидролизатов, и с помощью них управлять всем производственным циклом». Лабораторию оснастили современным аналитическим оборудованием, которое использовалось в научных целях при разработке различных белковых гидролизатов и питательных сред (аминокислотный анализатор, газовый хромато-масс-спектрометр, жидкостный хроматограф с фотометрическим и спектрофотометрическим детектированием, ЯМР-спектрометр и др.).

Такой подход позволил организовать лабораторию, которая отличалась от обычных «средоварок», основная деятельность которых заключалась в обеспечении лабораторий институтов биологического профиля готовыми питательными средами. Во ВНИИ прикладной микробиологии в лаборатории параллельно с решением аналогичной задачи проводилась научно-исследовательская работа.

Артюхин В.И. сплотил вокруг команду единомышленников, среди которых Марчихина И.И., Морозова Т.П., Шамичева И.Н., Савельева Г.М., Бизязева Г.В., Ажермачева Н.И., пришедшие в лабораторию одними из первых, а также Шепелин А.П., Храмов М.В., Домотенко Л.В., Миронова Е.Н., Полосенко О.В., Шолохова Л.П., Татаринцева Н.А., Дмитриева И.Ю., Сигаева Н.Н., активно включившиеся в решение новых задач по созданию и разработке питательных сред (фото 2).



Фото 2. Коллектив отдела питательных сред (1994 г.).

Основное направление научных исследований, проводимых в лаборатории в 70–80-х гг. прошлого века, было связано с заменой пищевого сырья на непищевое. При получении белковых гидролизатов задача заключалась в замене мяса как основного источника белка на альтернативное сырье. В качестве заменителей мяса испытывали отходы пищевой промышленности (рыбную муку, кровь, рога, копыта, кожу животных, перья птиц, соевую муку, подсолнечный и хлопковый шрот и др.), БВК (белково-витаминный концентрат) – протеинсодержащий продукт микробиологического синтеза. В результате всестороннего изучения свойств заменителей и полученных из них гидролизатов и была выбрана рыбная мука, которая до сих пор используется в производственном цикле изготовления питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ [1].

В ходе НИР разработаны технологические режимы производства кислотных и ферментативных гидролизатов рыбной муки, казеина, БВК и технологии получения экстрактов БВК и пекарных дрожжей. В то время создан уникальный гидролизат крови крупного рогатого скота, названный стимулятором роста гемофильных микроорганизмов. Разработанная технология позволила получить хорошо растворимый в воде препарат, выдерживающий автоклавирование и заменяющий кровь в составе некоторых питательных сред для микроорганизмов со сложными питательными потребностями: туляремийного микроба и легионелл.

Еще одним направлением исследований являлся поиск заменителей агара, который в то время в стране производился в основном пищевого качества, не позволяющего получать прозрачные питательные среды. Поиск заменителей агара производился среди полимеров медико-биологического назначения. В частности, были испытаны криогели поливинилового спирта и полиакриламидные гели [2].

Учитывая тематику Института, в лаборатории осуществлялись исследования по разработке питательных сред для выделения и культивирования возбудителей особо опасных инфекций (ООИ). Совместно с сотрудниками профилирующих лабораторий Института были созданы оригинальные питательные среды – Ft-агар, легионелбакагар, сибиреязвенная среда, среда для выделения чумного микроба. Ft-агар – питательная среда для выделения и культивирования возбудителя туляремии, не требует добавления крови или яичного желтка, обладает высокой чувствительностью, обеспечивает выделение туляремийного микроба всех подвигов при прямом посеве инфицированного материала [3].

В лаборатории были созданы питательные среды для глубинного культивирования возбудителей ООИ, которые позволяли получать вакцинные препараты нового поколения, дающие возможность одновременно с вакцинацией проводить лечение антибиотиками как человека, так и животных.

К концу 1980-х гг. объем научных исследований и работ по обеспечению лабораторий института питательными средами значительно расширился, что привело к реорганизации лаборатории в отдел питательных сред.

В 1988 г. сотрудники отдела переехали в новый четырехэтажный корпус общей площадью более 8 тыс. м<sup>2</sup>, оснащенный технологическим оборудованием, что дало начало новому направлению научных исследований – разработке технологии производства питательных сред в сухом виде. В производственных помещениях были смонтированы и запущены

в эксплуатацию промышленные сушильные установки, в том числе распылительные и установки с сушкой в псевдокипящем слое на инертных носителях. В рамках НИР отработаны режимы сушки белковых гидролизатов, условия дополнительной подготовки и смешивания компонентов питательных сред, условия хранения сухих питательных сред.

В 1993 г. во время начинающейся эпидемии дифтерии Правительством РФ принято Постановление «О неотложных мерах по предупреждению заболеваний дифтерией в Российской Федерации». В исполнении указанного Постановления Государственным Комитетом санитарно-эпидемиологического надзора России поручено ГосНИИ прикладной микробиологии (к тому времени так назывался институт) разработать и организовать промышленный выпуск питательной среды для выделения возбудителя дифтерии. Результатом активных работ стала сухая питательная среда – коринебакагар, не требующая добавления крови, обеспечивающая рост всех видов коринебактерий и их четкую дифференциацию [4]. Коринебакагар в кратчайшие сроки был зарегистрирован, после чего Институт получил Государственный заказ по обеспечению всех центров Госсанэпиднадзора данной питательной средой. В отделе был налажен промышленный выпуск коринебакагара в сухом виде, а затем коринетоксагара – питательной среды для определения токсигенности выделенных дифтерийных микробов, что позволило еще в те годы большинству территорий страны перейти на их использование при диагностике дифтерии и успешно справиться с ее эпидемией в стране. Коринебакагар остается актуальным в настоящее время и составляет основу лабораторной диагностики дифтерии в нашей стране, соответствующей требованиям современных нормативно-методических документов.

С момента выпуска первых серий коринебакагара начался новый этап в деятельности отдела – адаптация к рыночной экономике. Учитывая сложную экономическую ситуацию, которая сложилась в те далекие годы, с практически полным отсутствием финансовой поддержки научных исследований со стороны государства, нужен был другой подход к организации работ. В 1993 г. отдел «Питательные среды» возглавил А.П.Шепелин, и деятельность отдела была переориентирована на удовлетворение нужд практических служб здравоохранения и Госсанэпиднадзора. В короткие сроки были разработаны, зарегистрированы и внедрены в производство питательные среды общего назначения – ГРМ-агар (питательный агар), ГРМ-бульон (питательный бульон) [5]. Для обозначения уже известных потребителям питательных сред, таких как, например, среда Эндо, но выпускаемых в ФБУН ГНЦ ПМ с использованием гидролизатов рыбной муки, было решено в названии дополнительно использовать аббревиатуру ГРМ (например, среда Эндо-ГРМ).

В том же 1993 г. на основе отдела был создан коммерческий сектор, который начал заниматься реализацией производимых в отделе питательных сред. Все начиналось с небольших партий, которые иногда приходилось развозить заказчикам в разные города на личных машинах сотрудников. Это были сложные годы по бесперебойному снабжению производства расходными материалами и созданию структурных подразделений по маркетингу и сбыту готовой продукции.



Такой организационный подход позволил отделу не только выжить, но и ежегодно наращивать объем производства питательных сред. В 1994 г. уже было выпущено почти 8 т сухих питательных сред. А в 1995 г. отдел питательных сред стал укрупняться, и в последующие годы происходило почти полуторакратное ежегодное увеличение объема выпускаемой продукции.

Научные результаты исследований прошлых лет внесли значительный вклад в развитие фундаментальных представлений о возбудителях различных инфекций, включая особо опасные, и использованы при создании новых питательных сред.

В кратчайшие сроки разработаны технологии производства и налажен выпуск большого перечня питательных сред для выделения возбудителей кишечных инфекций, их идентификации и дифференциации. Среди них имеются уже известные, рекомендованные Приказами МЗ РФ, для обязательного применения в клинических и санитарно-бактериологических лабораториях. Это среды Эндо, Левина, Кесслера, Клиггера, селенитовый бульон, висмут-сульфит агар, среды Гисса с различными углеводами, среда Ресселя и др.; импортозамещающие питательные среды – SS-агар, SDS-бульон и уникальные – Сорбитол *E. coli* 0157:H7 агар, иерсиниозная среда. Перечисленные известные среды Эндо, Левина и др., которые выходят из стен предприятия с аббревиатурой ГРМ, по своим характеристикам не уступали аналогичным средам, изготовленным на других предприятиях по производству питательных сред. SS-агар (питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл) и SDS-бульон (питательная среда для выделения и дифференциации энтеробактерий) по физико-химическим и ростовым свойствам близки к своим импортным аналогам. Сорбитол *E. coli* 0157:H7 агар – питательная среда для выделения и дифференциации *Escherichia coli* 0157:H7, разработанная в тесном сотрудничестве с Тульским областным и Федеральным центрами Госсанэпиднадзора и ГИСК им. Л.А.Тарасевича, позволил выделить при вспышке в г. Туле летом 1997 г. возбудителя острых желудочно-кишечных заболеваний, протекающих с поражением желудочно-кишечного тракта и урогеморрагическим синдромом с летальными исходами, – *E. coli* 0157:H7. В сотрудничестве с Санкт-Петербургским НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера и Северо-Западной противочумной станцией создана и внедрена в производство питательная среда для выделения возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза (иерсиниозная среда), не имеющая аналогов в мире. Обладая высокой чувствительностью, среда позволяет выделять культуры *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* при прямом посеве инфицированного материала. Кроме этого, среда обеспечивает четкую дифференциацию иерсиний, других уреазо-положительных бактерий (клебсиелл, протеев), энтеробактерий (шигелл, сальмонелл, эшерихий) при полной ингибиции стафилококков и стрептококков [6].

Одно из направлений деятельности отдела связано с разработкой и организацией производства питательных сред, используемых для анализа состояния нормальной микрофлоры при исследовании дисбактериозов кишечника. Это питательные среды для выделения бифидобактерий, лактобацилл, энтерококков [7]. Питательная среда для выделе-

ния и культивирования бифидобактерий – бифидум-среда, не уступая по ростовым свойствам печеночной среде Блаурокка, имеет ряд преимуществ. Бифидум-среда выпускается в сухом виде, она более стандартна и, что немаловажно, на проведение одного анализа ее требуется в 10 раз меньше. Для выделения лактобацилл в отделе разработана питательная среда лактобакагар – аналог импортного MRS-агара. Лактобакагар, обладая селективным действием в отношении *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, обеспечивает рост всех видов *Lactobacillus*, включая высокотребовательные *L. brevis* и *L. fermentum*. Для выделения энтерококков создана питательная среда – энтерококкагар, предназначенный для исследования клинического материала, а также для использования при санитарном контроле качества пищевых продуктов, мясных и молочных консервов.

Новый этап в развитии отдела питательных сред начался в 2005 г. после перехода Центра по распоряжению Правительства РФ № 1514-р от 26.09.2005 в ведение Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзора). Руководители Роспотребнадзора проявляют большую заинтересованность в производственной деятельности отдела и всей организации в целом, вникают в суть проблем, возникающих при производстве медицинских изделий в современных условиях жесткой конкуренции, поощряют инициативы и оказывают поддержку во многих начинаниях.

В условиях рынка появились наряду с известными иностранными производителями новые отечественные фирмы, выпускающие питательные среды. Значительный рост конкуренции предъявляет жесткие требования к качеству, безопасности и эффективности выпускаемой продукции. В связи с этим сотрудники отдела особое внимание уделяют качеству выпускаемых питательных сред, расширяют номенклатуру.

Учитывая актуальность проблемы распространения устойчивости возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам, сотрудниками отдела разработана технология производства агара Мюллера–Хинтона, удовлетворяющего требованиям современных нормативных документов, включая ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing – Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller–Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing». Эффективность питательной среды доказана в ходе широких клинических испытаний с использованием музейных штаммов и изолятов возбудителей инфекционных болезней с различными спектрами антибиотикочувствительности [8].

Большое внимание в отделе уделяется созданию новых питательных сред. В последние годы разработан ряд питательных сред для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ): гемофилус-агар, менингоагар, шоколадный агар и ГБМ-агар, обеспечивающих рост трудно культивируемых основных возбудителей – *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* [9]. Внедрены в производство питательные среды для выделения и определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза, листерий, псевдомонад, клебсиелл и др.

В 2017 г. в отделе запущен в производство большой ассортимент питательных сред для санитарной микробио-

логии. Изменение структуры инфекционных болезней, появление продуктов питания ненадлежащего качества порождают постоянный спрос на новые диагностические препараты, адаптированные к новым условиям их применения. Разработаны и сертифицированы современные питательные среды для выделения стафилококков – агар Байрд-Паркера и агар Фогеля–Джонсона, для сульфитредуцирующих клостридий, для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий, в частности сальмонелл и шигелл, – XLD-агар и другие питательные среды.

Важным аспектом работы отдела является научно-образовательная деятельность. С целью предоставления актуальной информации о выпускаемых питательных средах и новых разработках создан сайт <https://sredy-obelensk.ru/>, где представлены каталог продукции, нормативно-методические документы, видеоматериалы по приготовлению и использованию питательных сред.

Результаты разработок и испытаний новых питательных сред регулярно публикуются в научных изданиях и журналах «Клиническая лабораторная диагностика», «Бактериология», «Инфекция и иммунитет» и др. Достигнутыми успехами сотрудники отдела делятся на национальных и международных конференциях. Так, на 44-й Всемирной конференции Международного союза борьбы с туберкулезом и болезнями легких в Париже (2013 г.) и на I конгрессе Национального общества фтизиатров (2013 г.) представлен доклад кандидата химических наук Домотенко Л.В., посвященный новым тест-наборам для ускоренного определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*. В ноябре 2015 г. в Ташкенте на Международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера» MICROBIOS-2015 Шепелин А.П. и Полосенко О.В. выступили с докладами о современных путях повышения качества микробиологических исследований с использованием новых питательных сред и иммунохроматографических тестов для клинической и санитарной микробиологии производства ФБУН ГНЦ ПМБ. В 2018 г. во время проведения международной конференции «Современное состояние и пути совершенствования лабораторной диагностики инфекционных болезней» в г. Шымкенте (Казахстан) Шепелин А.П. от имени ФБУН ГНЦ ПМБ подписал протокол о сотрудничестве с Международным казахско-турецким университетом им. Х.А.Ясави.

Традиционной площадкой для обсуждения актуальных вопросов в области клинической и санитарной бактериологии начиная с 2015 г. становится ежегодно проводимый Национальный конгресс бактериологов (фото 3). Организатор мероприятия – ФБУН ГНЦ ПМБ – ставит своей задачей объединить усилия научных и практических учреждений и их специалистов по совершенствованию процедуры выявления и идентификации возбудителей инфекционных болезней в сфере здравоохранения, ветеринарии, пищевой промышленности. В работе конгресса, как правило, принимают участие более 500 сотрудников Роспотребнадзора, практического здравоохранения, преподавателей высших учебных заведений и других организаций – специалистов в области клинической и санитарной микробиологии, биотехнологии, эпидемиологии практически из всех субъектов РФ, а также специалисты из Узбекистана, Беларуси, Казахстана, Гвинеи, Украины.



Фото 3. Президиум V Национального конгресса бактериологов в Москве.



Фото 4. Участники международной конференции Домотенко Л.В., Полосенко О.В., Кафтырева Л.А. и Алексева Е.А.

Помимо конгресса ФБУН ГНЦ ПМБ систематически организует международные и региональные научно-практические конференции и семинары, на которых ученые Центра (Шепелин А.П., Полосенко О.В., Домотенко Л.В., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Карцев Н.Н., Подкопаев Я.В., Косилова И.С. и др.) и специалисты из других ведущих институтов знакомят с актуальными проблемами и современными методами исследования в клинической и санитарной микробиологии (фото 4). За последние 10 лет проведены конференции в большинстве субъектов РФ и в Казахстане.

Научно-практические конференции вызывают широкий интерес ученых, практических врачей-бактериологов, сотрудников службы Роспотребнадзора, студентов медицинских вузов. Особое внимание в работе конференций уделяется теоретическим вопросам, включая новые подходы к диагностике инфекционных болезней на основе применения новых методов индикации возбудителей, обсуждается современная ситуация, связанная с устойчивостью микроорганизмов к антибактериальным препаратам, возможных решений проблем с учетом приобретенного опыта.

Заслуживает внимания проведение мастер-классов для врачей, занимающихся микробиологическими исследова-



Фото 5. Проведение мастер-класса по питательным средам производства ГНЦ ПМБ.

ниями, с демонстрацией результатов микробиологического посева на уже известные и вновь разработанные питательные среды ФБУН ГНЦ ПМБ для клинической и санитарной микробиологии (фото 5). Врачи-бактериологи с большим интересом знакомятся с особенностями роста микроорганизмов на широком ассортименте питательных сред, что помогает им в их дальнейшей работе по лабораторной диагностике инфекционных болезней и санитарно-бактериологическому контролю продуктов питания и объектов окружающей среды.

Проводимые мероприятия помогают установить и расширить профессиональные и научные связи со специалистами различного профиля и с общественными объединениями из РФ и зарубежных стран, способствуют наращиванию со-

трудничества и развитию тесных взаимосвязей с практическими микробиологами.

Такой формат взаимодействия позволяет отделу питательных сред не стоять на месте, расширять ассортимент питательных сред в соответствии с изменяющимися потребностями, поддерживать качество выпускаемых питательных сред на стабильно высоком уровне, следовать современным требованиям нормативно-правового регулирования производства и реализации нашей продукции. Выпускаемые питательные среды для клинической микробиологии зарегистрированы в качестве медицинских изделий в Росздравнадзоре, среды для санитарной микробиологии имеют сертификаты соответствия.

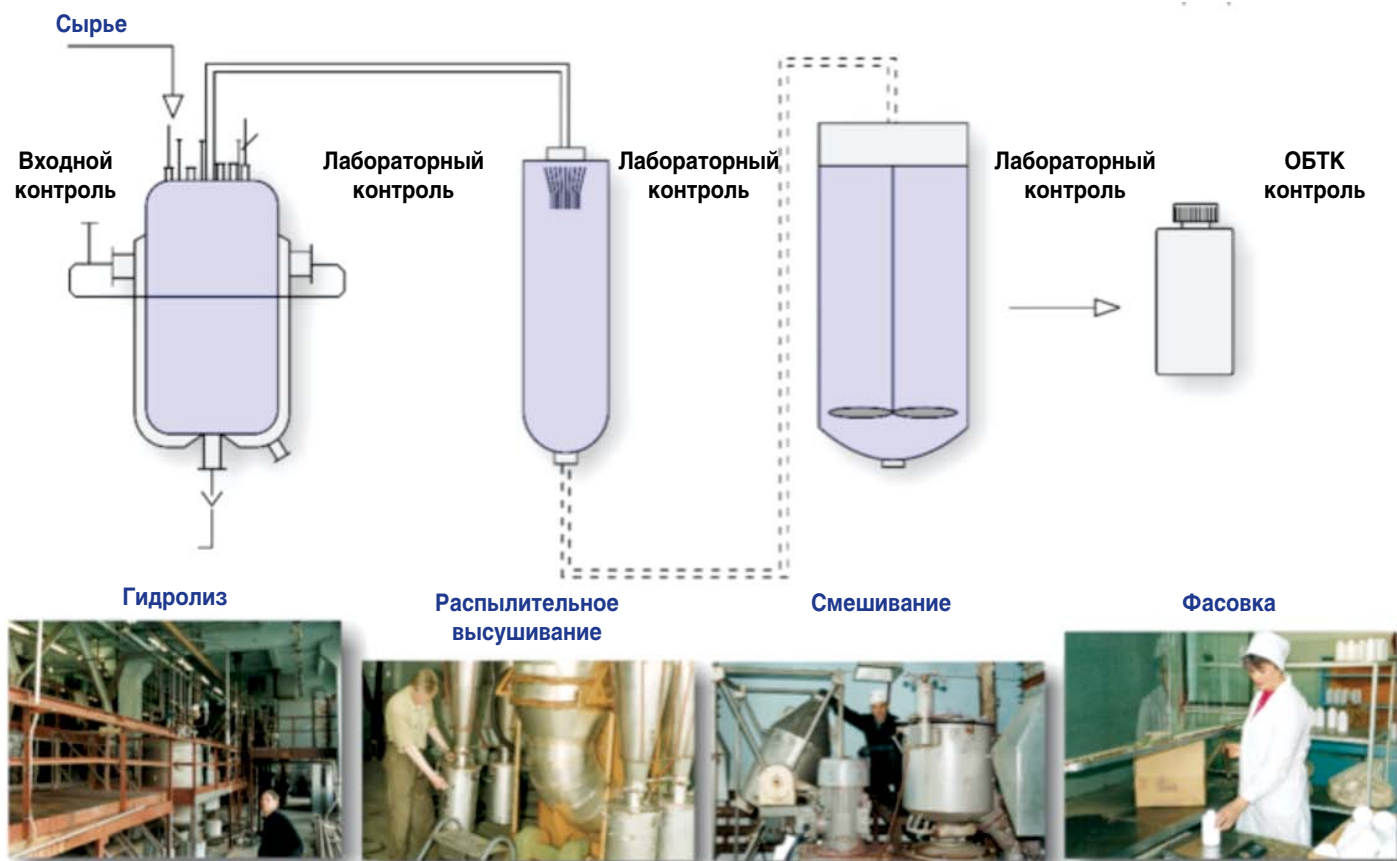


Фото 6. Схема производства питательных сред.

Особенностью питательных сред, производимых в ФБУН ГНЦ ПМБ, является их полное соответствие требованиям современных нормативно-методических документов по лабораторной диагностике и определению чувствительности возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам, контролю качества пищевых продуктов, лекарственных препаратов, кормов для животных, воды и объектов окружающей среды, проведению санитарно-гигиенического мониторинга.

Строгое следование современным требованиям удается обеспечивать за счет реализации полного цикла производства: от получения белковых гидролизатов до выпуска промышленных серий питательных сред; внедрения контроля качества на всех стадиях технологического процесса; проведения входного контроля сырья и контроля качества конечного продукта дополнительно сотрудниками независимого ОБТК; использования тест-штаммов микроорганизмов из Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», где поддерживается жизнеспособность и осуществляется контроль их свойств (фото 6).

Вектор развития производства питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ, сформированный еще в прошлом веке, сохраняет свое направление от научно-исследовательских работ до внедрения в производство, обеспечивает качество и безопасность продукции и позволяет оставаться ведущим производителем бактериологических питательных сред.

## Литература

1. Артюхин ВИ, Шепелин АП, Киселева Н.В. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред. Производство и применение продуктов микробиологических производств. Обзорн. информ. Вып. 9–10. М., 1990, 52 с.
2. Авторское свидетельство № 1213069. Способ приготовления плотной питательной среды для выращивания микроорганизмов, МПК С12N 1/00. Заявка: 3655786, 1983.10.25. Опубликовано: 1986.02.23. Дуда В.И., Рогожин С.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Мамцис А.М., Домотенко Л.В. и др.
3. Морозова ТП, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Оценка диагностических свойств прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремиального микроба (Ft-агара). Проблемы особо опасных инфекций. 2010; 105:50-3.
4. Пат. 2041947. Российская Федерация, МПК6 С12N 1/20. Питательная среда для выделения дифтерийного микроба. Шепелин АП, Татаринцева НА, Бязева ГВ, Артюхин ВИ; заявитель Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии; патентообладатель Государственный научно-исследовательский центр прикладной микробиологии. № 5030693/13; заявл. 04.03.92; опубл. 20.08.95.
5. Пат. 2089609 RU, МПК6 С12N 1/20. Питательная среда для выращивания микроорганизмов. Шепелин АП, Марчихина ИИ, Бабаева ТИ, Шолохова ЛП, Никольская НН; заявитель и патентообладатель Государственный научно-исследовательский центр прикладной микробиологии. № 93054024/13; заявл. 02.12.93; опубл. 10.09.97, Бюл. № 25.
6. Шепелин АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. М.: Династия; 2017, 232 с.
7. Домотенко ЛВ, Шепелин АП, Морозова ТП. Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника. Бактериология. 2016;1(1):48-53.
8. Домотенко ЛВ, Косилова ИС, Шепелин АП. Отечественный агар Мюллера–Хинтона: соответствие современным требованиям. Инфекция и иммунитет. 2019;9(2):409-16.
9. Подкопаев ЯВ, Домотенко ЛВ, Шепелин АП. Питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов. Протвино: А-Принт; 2019, 156 с.

### Информация об авторах:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: polosenko@obolensk.org

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

### Information about authors:

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), leading researcher of the microbiological research department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: polosenko@obolensk.org

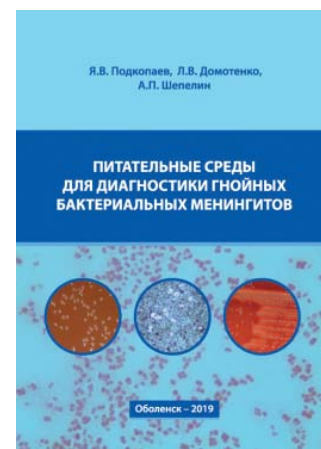
Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biology), deputy director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

## НОВЫЕ КНИГИ

**Питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов / [Я.В.Подкопаев, Л.В.Домотенко, А.П.Шепелин] – Протвино: А-Принт, 2019. – 156 с.: ил. ISBN 978-5-6043460-0-6**

Монография посвящена детальному описанию всех существующих в настоящее время элементов микробиологической диагностики при наиболее тяжелой форме инфекционной патологии – гнойных бактериальных менингитах (ГБМ). Представлена характеристика возбудителей ГБМ, широкий спектр фенотипических и генетических методов лабораторной диагностики, в том числе экспрессных. Особое внимание уделено бактериологическому методу с использованием питательных сред как «золотому стандарту» при диагностике ГБМ. Подробно описаны составы и способы приготовления питательных сред, используемых на всех этапах лабораторных исследований. Монография написана на основе проработки многочисленных новейших литературных данных и анализа результатов собственных многолетних исследований.

Монография адресована врачам-бактериологам, специалистам в области клинической микробиологии; будет полезна студентам высших и средних медицинских учреждений.



# Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

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

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

## Требования к оформлению статьи.

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

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

*Краткие сообщения* представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

### НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов\*, П. П. Петров\*\*

\*Первая организация, г. Москва, РФ

\*\*Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

**Статьи направлять по адресу:**

**142279, Московская обл.,**

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

**Тел. (4967) 36-00-46**

**Факс (4967) 36-00-10**

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

**или**

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