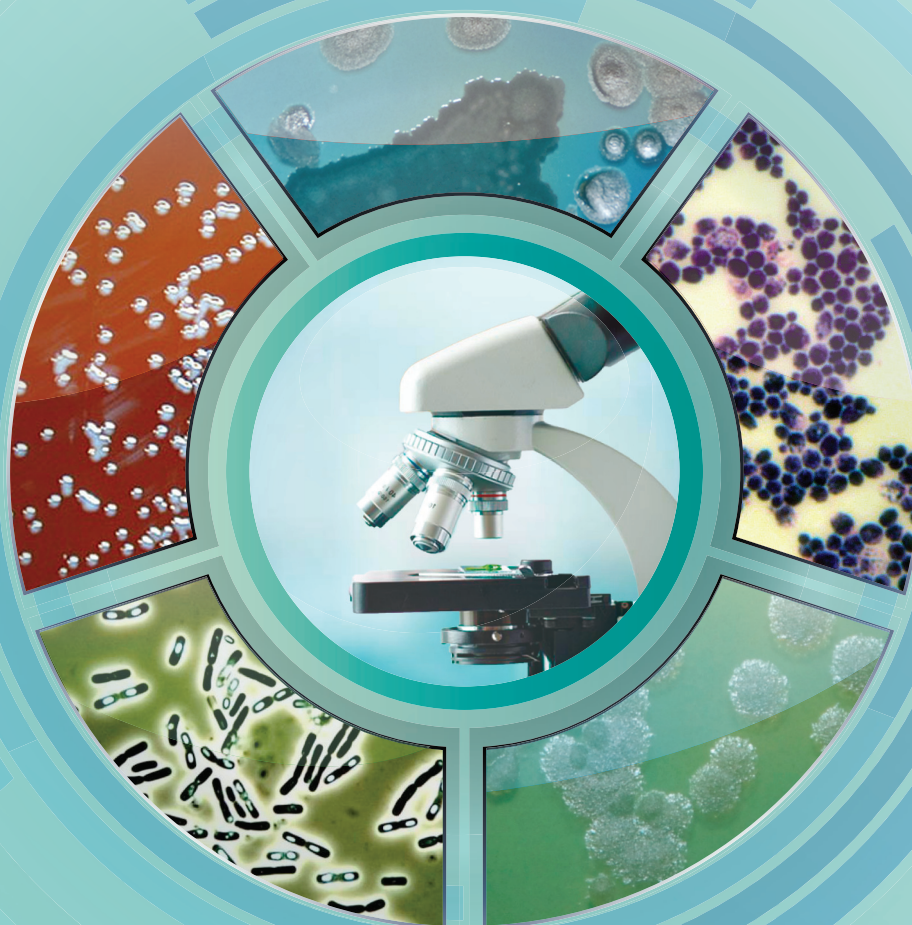


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2020 • том 5 • №1

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Н а у ч н о - п р а к т и ч е с к и й ж у р н а л

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,
г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
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 27.03.2020 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
ПН №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

От системной биологии к системной эпидемиологии	5
---	---

Экспериментальные статьи

INDEL-типирование – новый метод дифференциации штаммов <i>Helicobacter pylori</i> <i>В.М.Сорокин, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов</i>	8
Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей <i>А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, В.П.Мякина,</i> <i>В.М.Красильникова, В.В.Верёвкин, Е.А.Ганина, Н.В.Воложанцев</i>	14
Использование комплекса питательных сред для выявления заквасочных культур в кисломолочных продуктах <i>Т.П.Морозова, Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, И.С.Косилова, К.В.Детушев, А.П.Шепелин</i>	25
Выделение эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови <i>И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, О.И.Седых, В.А.Батулин, А.Д.Болатчиев, А.А.Ефременко</i>	33
Исследование взаимодействия антигенов и компонентов матрикса трансдермального варианта вакцин <i>М.Н.Киреев, М.В.Овчинникова, О.А.Волох, С.В.Борисова, А.К.Никифоров</i>	37
Сравнительный анализ питательных сред для определения биохимических свойств энтеробактерий <i>О.В.Полосенко, А.П.Шепелин</i>	41

Обзорная статья

Стратегии редактирования и модификации геномов бактериальных вирусов <i>А.С.Щурова, В.А.Баннов, А.В.Попова</i>	48
Правила для авторов	60

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

From systemic biology to systemic epidemiology	5
--	---

Experimental Articles

INDEL-typing: a new method of differentiation of <i>Helicobacter pylori</i> strains <i>V.M.Sorokin, A.S.Vodop'janov, R.V.Pisanov</i>	8
Effectiveness of bacteriophage Pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice <i>A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, V.P.Myakinina, V.M.Krasilnikova, V.V.Verevkin, E.A.Ganina, N.V.Volozhantsev</i>	14
Using of the nutrient complex for the identification of filling crops in dairy products <i>T.P.Morozova, L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, I.S.Kosilova, K.V.Detushev, A.P.Shepelin</i>	25
Isolation of endogenous antimicrobial peptides from blood cells <i>I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, O.I.Sedykh, V.A.Baturin, A.D.Bolatchiev, A.A.Efremenko</i>	33
Investigation of interactions between antigens and matrix components of transdermal vaccine candidates <i>M.N.Kireev, M.V.Ovchinnikova, O.A.Volokh, S.V.Borisova, A.K.Nikiforov</i>	37
Comparative analysis of nutrient media for determination of the biochemical properties of <i>Enterobacteria</i> <i>O.V.Polosenko, A.P.Shepelin</i>	41

Review Article

The strategy of editing and modification of the genomes of bacterial viruses <i>A.S.Schurova, V.A.Bannov, A.V.Popova</i>	48
Instructions for Authors	60

грибов, паразитов (около 300 за последние 50 лет) и их все более частом появлении при биологических эксцессах вспышечного и эпидемического характера. Результаты комплексного исследования патогенов с применением методов геномного, протеомного, транскриптомного, метаболомного и интерактомного анализа позволяют получать новые знания и создавать системы раннего выявления, идентификации и определения происхождения возбудителей, а также дают возможность говорить уже о концепции системной микробиологии. Это понятие для медицинских микробиологов означает использование методов системной биологии в области оценки на молекулярном, клеточном и популяционном уровнях взаимоотношений паразит–хозяин в сфере инфекционной патологии человека. Такие комплексные, многопараметрические исследования уже легли в основу понимания биологических свойств (патогенности, вирулентности, токсигенности, иммуногенности, инвазивности) микроорганизмов, представляющих наибольшую опасность для человеческой популяции, то есть высококонтагиозных. Недостаточная изученность большого количества патогенов, особенно новых, приводит к осложнениям эпидемического характера, как это произошло с появлением высоковирулентного и контагиозного вирусного патогена SARS-CoV-2, вызвавшего массовые заболевания COVID-19 в мире. После 2003 г., когда возбудитель SARS перестал проявляться на людях, а MERS проявлялся эпизодически только в отдельных странах, работы по изучении патогенов этого типа перестали носить систематический характер, что существенным образом сказалось на понимании природы возбудителя, вызвавшего COVID-19, и оперативности в разработке вакцины для специфической профилактики. Наличие системных сведений о предшественниках SARS-CoV-2 и завершенных разработок по вакцине (даже в варианте прототипов или компьютерных моделей) позволило бы иметь совершенно другую ситуацию в начале развития пандемии. При возникновении вспышки кишечного геморрагического эшерихиоза в 2011 г. в Германии в течение 10 дней микробиологи не могли выделить возбудитель и идентифицировать его. Между тем сходный с вызвавшим вспышку штамм *Escherichia coli* O104:H4 выделялся ранее в Южной Корее и Грузии, но системной информации о возбудителе с энтероаггративным механизмом поражения (серовариант, наличие плазмид и генов вирулентности и т.д.) в общедоступных источниках и базах данных не было. Такая ситуация и привела к существенной задержке в постановке диагноза, заражению и смерти большого количества людей.

Эти примеры свидетельствуют о том, что необходимо в постоянном режиме вести многопрофильные исследования опасных патогенов, даже если они не проявляются в виде периодических вспышек, создавать общедоступные базы данных об их свойствах и поисковые системы по ключевым филогеномным признакам. Системная биология при этом является одним из ключевых механизмов, обеспечивающих адекватный ответ на вызовы эпидемиологического характера, так как основой для быстрых разработок является наличие генетических баз данных о возбудителях и сведения о их физиологических особенностях, а также уже наработанные образцы протективных и диагностически значимых молекул.

В связи с накоплением большого количества разнообразной информации в этой области наметился переход от системной биологии через системную микробиологию патогенов к общей системной эпидемиологии. Можно на современном этапе выделить общие элементы (области знаний), которые связывают системную биологию и эпидемиологию.

Системная биология. Хозяин – физиологические и генетические особенности, иммунологический статус (включая уровень врожденного иммунитета). Патоген – вирулентность, изменчивость, разнообразие штаммов, геномное разнообразие (для идентификации и определения происхождения), инвазивность, контагиозность, резистентность к лекарственным средствам и дезинфектантам, противодействие системам защиты хозяина. Взаимоотношения хозяин–паразит – взаимодействия макро- и микроорганизма при адгезии и инвазии; системы, обеспечивающие проникновение патогена в клетки и кровяное русло хозяина; триггерные механизмы синтеза токсических для хозяина продуктов; способность макроорганизма противостоять инфекционному агенту и восстанавливать гомеостаз после болезни.

Эпидемиология. Общие задачи – закономерности распространения болезней, выявление причин и условий их появления, выработка мер профилактики и прогнозирование распространения. Молекулярная эпидемиология – использование методов системной биологии: генетические (метагеномный анализ образцов на наличие патогенов), иммунохимические и

протеомные (выявление антител к возбудителям и состояние клеточного звена иммунитета, в том числе для определения иммунной прослойки населения).

Общие для системной биологии и эпидемиологии дисциплины и методологии. Экология, демография, социология, гигиена, факторы возникновения и распространения болезней (биологические, социальные, природно-климатические). Козволюция в системе хозяин–патоген, выявляемая на молекулярном уровне в результате исследования метаболических реакций обеих сторон методами интерактомики (исследование взаимодействий). Применение таких подходов позволит решать ключевые эпидемиологические задачи методами системной биологии.

Таким образом, системная эпидемиология – это междисциплинарная концепция, использующая при решении своих задач множественные высокопроизводительные технологии системной биологии, часть которых уже прочно вошла в практику расследования вспышек инфекционных болезней и схемы разработки профилактических и лекарственных средств.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
академик РАН И.А.Дятлов*

INDEL-типирование – новый метод дифференциации штаммов *Helicobacter pylori*

В.М.Сорокин, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов

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

Впервые предложен метод INDEL-типирования штаммов *Helicobacter pylori*. Проведен анализ нуклеотидных последовательностей 69 штаммов из локальной базы данных. Выявлено десять INDEL-маркеров, пять из которых, с наиболее высокой вариабельностью, послужили основой для создания схемы дифференциации. Проведено INDEL-типирование 21 штамма *H. pylori* различного географического происхождения и выявлено 15 индивидуальных генотипов с высоким индексом разнообразия ($DI = 0.95$). Для проведения кластерного анализа использован метод MST (минимальное остоновое дерево), который продемонстрировал четкое распределение кластеров согласно географическому происхождению изученных штаммов. В дополнение к предлагаемому методу типирования при необходимости можно использовать метод MLVA-типирования.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, ПЦР, INDEL, MST-дендрограмма, MLVA, географическое происхождение

Для цитирования: Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Писанов Р.В. INDEL-типирование – новый метод дифференциации штаммов *Helicobacter pylori*. Бактериология. 2020; 5(1): 8–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-8-13

INDEL-typing: a new method of differentiation of *Helicobacter pylori* strains

V.M.Sorokin, A.S.Vodop'janov, R.V.Pisanov

Rostov-on-Don Anti plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

For the first time INDEL-typing method of *Helicobacter pylori* strains is offered. Analysis of the nucleotide sequences of 69 strains from the local database was carried out. Ten INDEL-markers were identified, five of which, with the highest variability, served as the basis for the differentiation scheme. INDEL-typing of twenty one strains of *H. pylori* of different geographical origin was carried out. And fifteen individual genotypes with a high diversity index were identified ($DI = 0.95$). For cluster analysis, the MST (minimal spanning tree) method was used, which demonstrated a clear distribution of clusters according to the geographical origin of the strains studied. In addition to the proposed method of typing, if necessary, the MLVA-typing method can be used.

Keywords: *Helicobacter pylori*, PCR, INDEL, MST dendrogram, MLVA, geographical origin

For citation: Sorokin V.M., Vodop'janov A.S., Pisanov R.V. Genetic profiling of actual for the Sochi region casual agents of natural focal and gastrointestinal infections. Bacteriology. 2020; 5(1): 8–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-8-13

Н*elicobacter pylori* ассоциируют с такими заболеваниями, как хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, лимфома и рак желудка [1–4]. Этим возбудителем инфицировано около 60% населения планеты, что позволяет считать хеликобактериоз одной из наиболее распространенных в мире инфекций [5, 6]. Инфицированность *H. pylori* взрослого населения России варьирует от 50 до 80%, а в некоторых регионах приближается к 100% [7, 8].

Важной отличительной особенностью *H. pylori* является высокая генетическая вариабельность штаммов, связан-

ная со значительной частотой эндогенных мутаций и обеспечивающая низкую встречаемость идентичных аллелей [9]. Кроме того, клетки *H. pylori* обладают природной компетентностью и могут интегрировать чужеродную ДНК в собственный геном посредством рекомбинации и производить обмен генетической информацией между различными штаммами, обитающими в одном желудке [10]. Как следствие, *H. pylori* является видом без существенной клональной структуры [10, 11]. Генетическое разнообразие *H. pylori* было доказано с помощью различных методических подходов [11–16].

Для корреспонденции:

Сорокин Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории туляремии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9113
E-mail: soroka53@mail.ru

Статья поступила 25.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

For correspondence:

Vladimir M. Sorokin, PhD (Biology), senior researcher of the tularemia laboratory of Rostov-on-Don Anti plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksim Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-91-13
E-mail: soroka53@mail.ru

The article was received 25.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

Используя метод мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) семи генов жизнеобеспечения (*urel*, *mutY*, *efp*, *ppa*, *yphC*, *atpA*, *trpC*), Achtman et al. [11] установили глобальную структуру популяции *H. pylori* с группировкой бактериальных изолятов согласно их географическому происхождению. Первоначально ими были описаны две группы штаммов со слабой клональной структурой: Asian Clone (азиатские штаммы) и Clone2 (штаммы из остальных частей мира). Позднее Falush et al. [17] выделили четыре группы штаммов с различным географическим происхождением: hpEurope, hpAfrica 1 (впоследствии разделенных на hspWAfrica и hspSAfrica), hpAfrica 2 и hpEastAsia (состоящую из hspAmerind, hspEAsia и hspMaori) [17]. Структура популяции штаммов *H. pylori*, циркулирующих в России, на сегодняшний день практически не изучена.

Для изучения филогенетических связей между штаммами некоторых других микроорганизмов, кроме метода MLST-типирования, широко применяется метод INDEL-типирования [18–21]. До настоящего времени метод INDEL-типирования штаммов *H. pylori* в мировой литературе не описан.

Целью настоящего исследования является выявление INDEL-маркеров в геноме *H. pylori* и оценка возможности их использования для изучения филогенетических связей между штаммами из базы данных GenBank с известным географическим происхождением.

Материалы и методы

Для создания локальной базы данных геномов *H. pylori* были использованы как полные геномы из базы данных GenBank, так и риды, представленные в Internet-базах данных. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [22]. Сравнительный анализ открытых рамок считывания (генов) проводили при помощи авторской программы GeneExpert, написанной на языке программирования Java. Варибельность обнаруженных инсерций/делеций (INDEL) оценивали по методу Симпсона (diversity index, DI) [23].

Конструирование праймеров и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in silico* осуществляли при помощи авторских программ PrimerM и VirtualPCR. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [24]. Для построения филогенетического дерева методом MST (minimal spanning tree) использовали пакет программ Bionumerix 7.6.

Результаты и обсуждение

Для сравнительного анализа геномов *H. pylori*, представленных в базе данных GenBank, с помощью авторского программного обеспечения была создана локальная база данных нуклеотидных последовательностей 69 штаммов *H. pylori*. С помощью программы GeneExpert проведено попарное сравнение более 1500 открытых рамок считывания в геномах штаммов локальной базы данных для детекции всех INDEL-маркеров с предустановленным размером 6–20 п.н. Обнаружено 10 локусов, содержащих INDEL-мар-

Таблица 1. Частота варибельности INDEL-локусов (на 69 штаммах)

Локус	Аллель, п.о.	Частота	Варибельность
hp195	68	0,65	0,50
	69	0,10	
	80	0,25	
hp 1080	95	0,78	0,36
		0,17	
		0,04	
hp 2575	125	0,09	0,42
	97	0,74	
	103	0,17	
hp 3330	60	0,81	0,31
	69	0,19	
	93	0,23	
hp 5605	102	0,74	0,40
		0,03	
		0,32	
hp 6405	106	0,68	0,43
	100	0,62	
	79	0,23	
hp 340	85	0,14	0,54
		0,61	
		0,12	
hp 1390	64	0,28	0,54
	76	0,49	
	108	0,33	
hp 3660	96	0,17	0,62
	93	0,93	
	62	0,07	
hp 4135	71		0,13

Примечание: наличие пустых ячеек связано с высокой степенью генетического полиморфизма бактерий *H. pylori* и означает отсутствие ампликона *in silico*.

керы. Для всех 10 локусов, содержащих INDEL-маркеры, определена варибельность каждого индивидуального локуса (табл. 1).

Для дальнейшего исследования были выбраны 6 наиболее варибельных локусов (hp 3330, hp 5605, hp 6405, hp 340, hp 1390, hp 3660).

Виртуальная ПЦР и построение кладограммы

Для проведения ПЦР *in silico* были сконструированы праймеры с помощью авторской программы PrimerM. Был проведен кластерный анализ по методу UPGMA для 18 штаммов с известным географическим происхождением из наиболее распространенных популяций (hpEurope, hspWAfrica, hspEAsia) [25] с использованием 6 INDEL-локусов (рис. 1).

Представленные результаты INDEL-типирования с помощью ПЦР демонстрируют хорошую корреляцию распределения кластеров с географическим происхождением штаммов *H. pylori*, за исключением двух штаммов hpEurope. Кластер А представлен исключительно штаммами, принадлежащими к популяции hspEAsia, кластер В содержит 4 из 6 штаммов hpEurope. Кластер С содержит как штаммы hpEurope, так и штаммы hspWAfrica. Кластер D представлен двумя генетически удаленными штаммами hspWAfrica. С помощью программы AuSeTTS (Automated Selection of Typing Target Subsets) [26] проведена оптимизация набора 6 INDEL-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов. Показано, что исключение локуса hp 3330 практически не влияет на разрешающую способность метода (14 индивидуальных генотипов), позволяет выявить у 18 штаммов *H. pylori* 13 индивидуальных генотипов с высоким индексом разнообразия (DI = 0,95) и позволяет исполь-

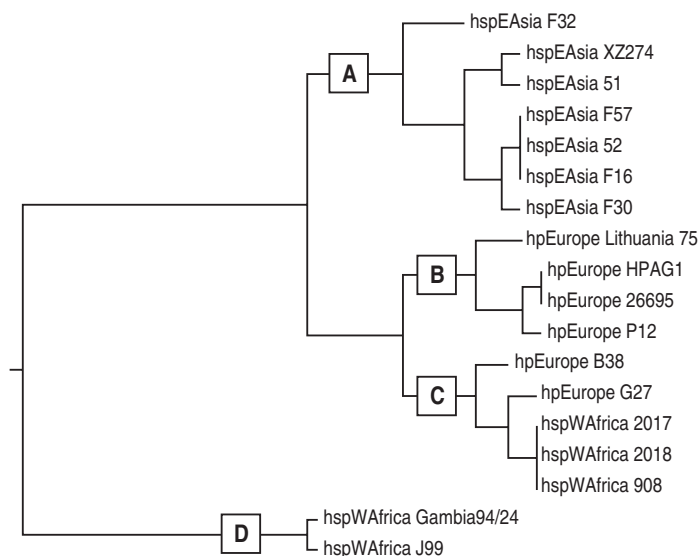


Рис. 1. Кладограмма распределения INDEL-генотипов штаммов *H. pylori* различного географического происхождения.

зовать метод для практической дифференциации штаммов как *in silico*, так и *in vitro*.

Построение и анализ филогенетического дерева

В последнее время для выяснения филогенетических связей между штаммами микроорганизмов разных видов все чаще применяется наиболее точный метод построения минимального остоного дерева (MST) [27–29]. Для типирования *in silico* к 18 ранее изученным штаммам были добавлены 3 штамма из популяции hpEurope, наиболее широко

представленной в Европе. Для исследования 21 штамма *H. pylori* из базы данных GenBank использованы 5 INDEL-локусов (hp 5605, hp 6405, hp 340, hp 1390, hp 3660). Результаты MST-анализа представлены на рис. 2.

Кластер В представлен исключительно штаммами, принадлежащими к популяции hspEAsia. Кластер А представлен только штаммами, принадлежащими к популяции hspWAfrica, а кластер С содержит европейские штаммы (hpEurope). MST-анализ *in silico* продемонстрировал более четкое разделение штаммов на кластеры согласно их географическому происхождению. Необходимо отметить значительную вариабельность индивидуальных генотипов внутри каждой из популяций: 3 индивидуальных генотипа у hspWAfrica, 5 генотипов у hspEAsia и 7 – у hpEurope. Высокая степень генетического разнообразия у hpEurope обусловлена смешением двух прародительских популяций AE1 и AE2, которые, возможно, достигли Европы в разное время и из разных источников: AE1 действительно присутствовала во всей Центральной Азии в дополнение к Европе, AE2 пришла из Северной Африки и Средней Азии [30]. В недавнем исследовании Vale et al. [31] смогли дифференцировать две европейских популяции, представленных в основном в Северной Европе (с генетическим родством с AE1) и Южной Европе (с генетическим родством с AE2). Исследование было построено на типировании нуклеотидной последовательности двух профагов *H. pylori*. Распределение INDEL-генотипов в кластере штаммов hpEurope также свидетельствует о существовании двух отличающихся друг от друга групп штаммов (рис. 2). Для увеличения разрешающей способности предлагаемого метода INDEL-типирования можно использовать описанный нами ранее способ MLVA-

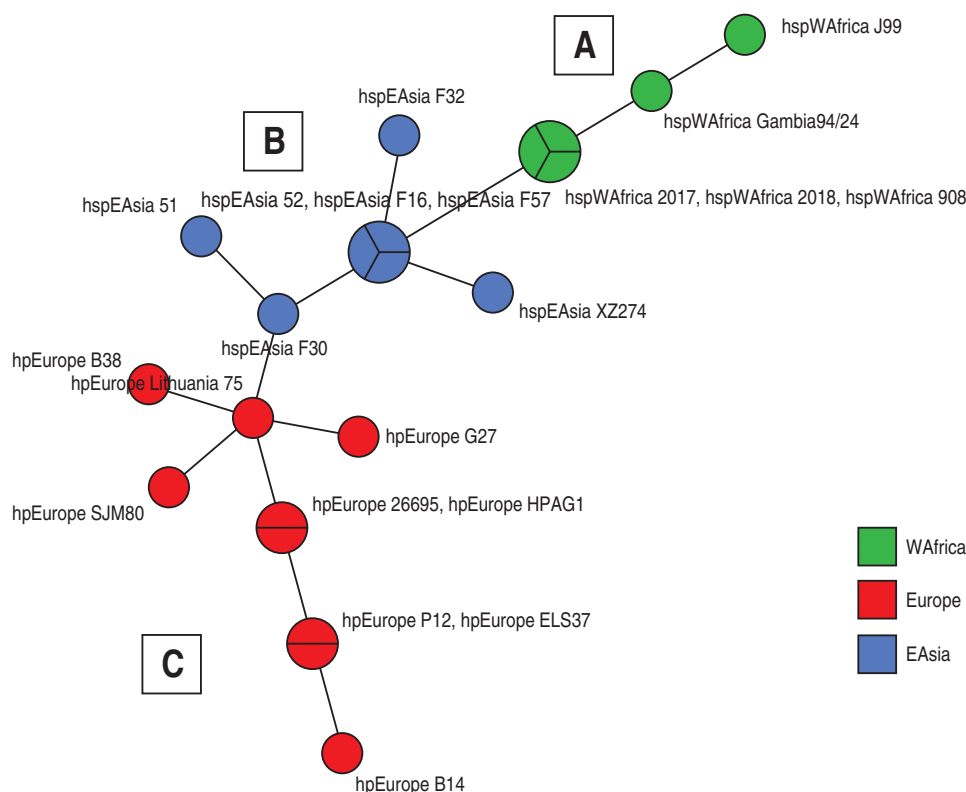


Рис. 2. Кладограмма распределения INDEL-генотипов штаммов *H. pylori* различного географического происхождения, полученная с помощью метода MST.

Таблица 2. VNTR-генотипы трех штаммов hspWAfrica *H. pylori*

Штаммы <i>H. pylori</i>	VNTR-локусы <i>H. pylori</i> [16]		
	HpA (число повторов)	HpD (число повторов)	HpG (число повторов)
hspWAfrica 908	4	2	0
hspWAfrica 2017	5	5	0
hspWAfrica 2018	2	3	0

типирования *H. pylori* [16]. Например, кластер А содержит три штамма *H. pylori* с одинаковым INDEL-генотипом. Ранее было показано, что штаммы hspWAfrica 2017 и 2018 являются клонами родительского штамма hspWAfrica 908, выделенными от одного пациента. Сравнительный анализ геномов штаммов 2017 и 2018 показал, что они почти идентичны и произошли от штамма 908 [32]. Оказалось, что применение метода MLST-типирования не дает возможности различить генотипы указанных штаммов, а их разделение возможно только при использовании полногеномного SNP-типирования [33]. Такой же результат достигается применением метода MLVA-типирования (табл. 2).

Создана локальная база данных нуклеотидных последовательностей 69 штаммов *H. pylori*. Проведено попарное сравнение более 1500 открытых рамок считывания в геномах штаммов локальной базы данных для детекции всех INDEL-маркеров с предустановленным размером 6–20 п.н. Обнаружено 10 локусов, содержащих INDEL-маркеры. Для типирования штаммов *H. pylori* различного географического происхождения выбраны 5 наиболее вариабельных локусов. Показано, что кластеризация штаммов по INDEL-маркерам коррелирует с данными, полученными при MLST-типировании. Разработанная схема типирования имеет высокий индекс разнообразия ($DI = 0,95$) и может быть дополнена ранее предложенным методом MLVA-типирования. На предлагаемый способ получен патент «Способ дифференциации штаммов *Helicobacter pylori* путем молекулярно-генетического типирования» (патент № 2 688 434 от 21.05.2019). В дальнейшем предполагается проведение INDEL-типирования *in vitro* региональных российских штаммов *H. pylori* с целью определения их географического происхождения.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. 1984 Jun 16;1(8390):1311-5. DOI: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6
- Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BJ. Campylobacter pyloridis, gastritis, and peptic ulceration. J Clin Pathol. 1986 Apr;39(4):353-65. DOI: 10.1136/jcp.39.4.353
- Marshall BJ. Campylobacter pyloridis and gastritis. 1986 Apr;153(4):650-7. DOI: 10.1093/infdis/153.4.650
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 1995;55(10):2111-5.
- Frenc R, Clemens J. Helicobacter in the developing world. Microbes Infect. 2003 Jul;5(8):705-13. DOI: 10.1016/s1286-4579(03)00112-6
- Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther. 1995;9 Suppl 2:33-9.
- Rothenbacher D. Burden of *H. pylori* and diseases in developed countries; recent developments and future implications. Microbes Infect. 2003 Jul;5(8):693-703. DOI: 10.1016/s1286-4579(03)00111-4
- Malaty H, Paykov V, Bykova O, et al. *Helicobacter pylori* and socioeconomic factors in Russia. Helicobacter. 1996;1:82-7.
- Wang G, Humayun MZ, Taylor DE. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. Trends Microbiol. 1999;7:488-93. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01632-7
- Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:12619-24. DOI: 10.1073/pnas.95.21.12619
- Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol Microbiol. 1999 May;32(3):459-70. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01382.x
- Guo C, Liao Y, Li Y, Duan J, Guo Y, Wu Y, et al. Genotyping analysis of *Helicobacter pylori* using multiplelocus variable-number tandem-repeats analysis in five regions of China and Japan. 2011 Sep 3;11:197. DOI: 10.1186/1471-2180-11-197
- Kang J, Blaser MJ. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. Nat Rev Microbiol. 2006 Nov;4(11):826-36. DOI: 10.1038/nrmicro1528
- Han SR, Zschausch HC, Meyer HG, Schneider T, Loos M, Bhakdi S, Maeurer MJ. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. J Clin Microbiol. 2000 Oct;38(10):3646-51.
- Sorokin V, Pisanov R, Golubkina E, Bereznyak E, Prozorova L. Comparative Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of *Helicobacter pylori* Isolates from South of Russia. International Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017;2(3):135-8. DOI: 10.11648/j.ijmb.20170203.15
- 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;1-7. DOI: 10.9734/AJBGM/2018/v1i430045
- Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science. 2003 Mar 7;299(5612):1582-5. DOI: 10.1126/science.1080857
- Liu F, Hu Y, Wang Qi, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. BMC Genomics. 2014 Jun 13;15(1):469. DOI: 10.1186/1471-2164-15-469
- Larsson P, Svensson K, Karlsson L. Canonical Insertion-Deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. Emerging Infectious Diseases. 2007 Nov;13(11):1725-32. DOI: 10.3201/eid1311.070603
- Li K, Gu W, Liang J, et al. Gene polymorphism analysis of *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein A and putative outer membrane protein A family protein. BMC Genomics. 2014 Mar 16;15(1):201. DOI: 10.1186/1471-2164-15-201
- Водопьянов АС, Водопьянов СО, Олейников ИП, Мишанькин БН. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017;22(4):195-200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology. 2012;19(5):455-477.
- Simpson EH. Measurement of diversity. Nature (London). 1949;163(4148):668.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance,

- and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011 Oct; 28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
25. Kawai M, Furuta Y, Yahara K, et al. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiology*. 2011 May 16;11:104. DOI: 10.1186/1471-2180-11-104
 26. O'Sullivan MV, Sintchenko V, Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics*. 2013 May 1;14:148. DOI: 10.1186/1471-2105-14-148
 27. Wilkinson DA, O'Donnell AJ, Akhter RN, Fayaz A, Mack HJ, Rogers LE, et al. Updating the genomic taxonomy and epidemiology of *Campylobacter hyointestinalis*. *Sci Rep*. 2018 Feb 5;8(1):2393. DOI: 10.1038/s41598-018-20889-x
 28. Blouin Y, Hauck Y, Soler C, Fabre M, Vong R, et al. Significance of the Identification in the Horn of Africa of an Exceptionally Deep Branching *Mycobacterium tuberculosis* Clade. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e52841. DOI: 10.1371/journal.pone.0052841
 29. Boujemaa S, Allaya AB, Mlik B, Mardassi H, Mardassi BBA. Phylogenetics of *Mycoplasma hominis* clinical strains associated with gynecological infections or infertility as disclosed by an expanded multilocus sequence typing scheme. *Sci Rep*. 2018 Oct 5;8(1):14854. DOI: 10.1038/s41598-018-33260-x
 30. Megraud F, Lehours P, Vale FF. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016 Nov; 22(11):922-927. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.07.013
 31. Vale FF, Vadivelu J, Oleastro M, Breurec S, Engstrand L, Perets TT, et al. Dormant phages of *Helicobacter pylori* reveal distinct populations in Europe. 2015 Sep 21; 5:14333. DOI: 10.1038/srep14333
 32. Avasthi, Tiruvayipati Suma, Singamaneni Haritha Devi, Todd D. Taylor, Narender Kumar, Ramani Baddam, et al. Genomes of two chronological isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* strain 908 obtained from a single patient. *J Bacteriol*. 2011 Jul;193(13):3385-6. DOI: 10.1128/JB.05006-11
 33. Tsang AK, Lee HH, Yiu SM, Lau SK, Woo PC. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. 2017 Jul 3;7(1):4536. DOI: 10.1038/s41598-017-04707-4
 34. Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen MM, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017 Aug;153(2):420-429. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.04.022
 9. Wang G, Humayun MZ, Taylor DE. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 1999;7:488-93. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01632-7
 10. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 12619-24. DOI: 10.1073/pnas.95.21.12619
 11. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*. 1999 May;32(3):459-70. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01382.x
 12. Guo C, Liao Y, Li Y, Duan J, Guo Y, Wu Y, et al. Genotyping analysis of *Helicobacter pylori* using multiplelocus variable-number tandem-repeats analysis in five regions of China and Japan. 2011 Sep 3;11:197. DOI: 10.1186/1471-2180-11-197
 13. Kang J, Blaser MJ. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Nov; 4(11):826-36. DOI: 10.1038/nrmicro1528
 14. Han SR, Zschausch HC, Meyer HG, Schneider T, Loos M, Bhakdi S, Maeurer MJ. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct;38(10):3646-51.
 15. Sorokin V, Pisanov R, Golubkina E, Bereznyak E, Prozorova L. Comparative Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of *Helicobacter Pylori* Isolates from South of Russia. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;2(3):135-8. DOI: 10.11648/j.ijmb.20170203.15
 16. 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*. 2018:1-7. DOI: 10.9734/AJBGM/2018/v1i430045
 17. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003 Mar 7; 299(5612):1582-5. DOI: 10.1126/science.1080857
 18. Liu F, Hu Y, Wang Qi, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *BMC Genomics*. 2014 Jun 13;15(1):469. DOI: 10.1186/1471-2164-15-469
 19. Larsson P, Svensson K, Karlsson L. Canonical Insertion-Deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerging Infectious Diseases*. 2007 Nov; 13(11):1725-32. DOI: 10.3201/eid1311.070603
 20. Li K, Gu W, Liang J, et al. Gene polymorphism analysis of *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein A and putative outer membrane protein A family protein. *BMC Genomics*. 2014 Mar 16;15(1):201. DOI: 10.1186/1471-2164-15-201
 21. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Oleinikov IP, Mishankin BN. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiology and Infectious Diseases (Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni)*. 2017;22(4):195-200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200
 22. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455-477.
 23. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature (London)*. 1949;163(4148):668.
 24. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011 Oct; 28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
 25. Kawai M, Furuta Y, Yahara K, et al. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiology*. 2011 May 16;11:104. DOI: 10.1186/1471-2180-11-104
 26. O'Sullivan MV, Sintchenko V, Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics*. 2013 May 1;14:148. DOI: 10.1186/1471-2105-14-148
 27. Wilkinson DA, O'Donnell AJ, Akhter RN, Fayaz A, Mack HJ, Rogers LE, et al. Updating the genomic taxonomy and epidemiology of *Campylobacter hyointestinalis*. *Sci Rep*. 2018 Feb 5;8(1):2393. DOI: 10.1038/s41598-018-20889-x

References

28. Blouin Y, Hauck Y, Soler C, Fabre M, Vong R, et al. Significance of the Identification in the Horn of Africa of an Exceptionally Deep Branching *Mycobacterium tuberculosis* Clade. PLoS ONE. 2012;7(12):e52841. DOI: 10.1371/journal.pone.0052841
29. Boujemaa S, Allaya AB, Mlik B, Mardassi H, Mardassi BBA. Phylogenetics of *Mycoplasma hominis* clinical strains associated with gynecological infections or infertility as disclosed by an expanded multilocus sequence typing scheme. Sci Rep. 2018 Oct 5;8(1):14854. DOI: 10.1038/s41598-018-33260-x
30. Megraud F, Lehours P, Vale FF. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. Clinical Microbiology and Infection. 2016 Nov; 22(11):922-927. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.07.013
31. Vale FF, Vadivelu J, Oleastro M, Breurec S, Engstrand L, Perets TT, et al. Dormant phages of *Helicobacter pylori* reveal distinct populations in Europe. 2015 Sep 21; 5:14333. DOI: 10.1038/srep14333
32. Avasthi, Tiruvayipati Suma, Singamaneni Haritha Devi, Todd D. Taylor, Narender Kumar, Ramani Baddam, et al. Genomes of two chronological isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* strain 908 obtained from a single patient. J Bacteriol. 2011 Jul;193(13):3385-6. DOI: 10.1128/JB.05006-11
33. Tsang AK, Lee HH, Yiu SM, Lau SK, Woo PC. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. 2017 Jul 3;7(1):4536. DOI: 10.1038/s41598-017-04707-4
34. Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen MM, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. Gastroenterology. 2017 Aug;153(2):420-429. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.04.022

Информация об авторах:

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

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

Information about authors:

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

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

НОВОСТИ НАУКИ**Кишечная флора поможет создать универсальную донорскую кровь**

Донорская кровь требуется постоянно: и для экстренных оперативных вмешательств, и для плановых переливаний. Но переливать можно только совместимую кровь, и ученые работают над созданием универсальной донорской крови с помощью ферментов кишечных бактерий человека.

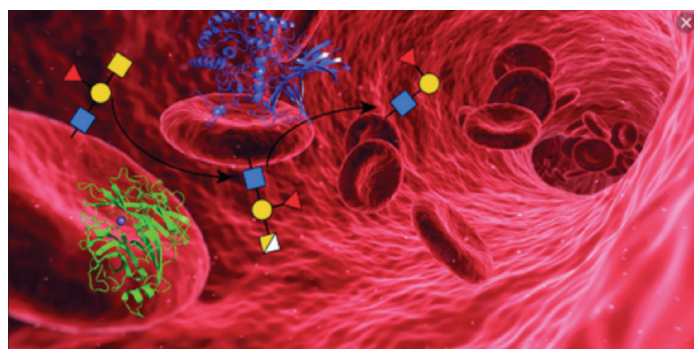
Совместимость крови зависит от особых молекул (антигенов – гликопротеинов или гликолипидов), которые находятся на поверхности красных кровяных клеток – эритроцитов.

Если человеку перелить кровь несовместимой группы, то произойдет опасная для жизни иммунная реакция и эритроциты слипнутся. Но нельзя ли создать универсальную кровь, искусственно «срезав» с эритроцитов «ненужные» молекулы?

Ученые из Университета Британской Колумбии (Канада) обнаружили, что некоторые из кишечных бактерий человека производят ферменты, которые расщепляют муцины, входящие в состав слизи, покрывающей стенку кишечника. Структура этих соединений похожа на антигены эритроцитов. Исследователи выделили из образцов фекалий бактериальную ДНК и провели поиск генов, кодирующих белки, способные расщеплять антигены, определяющие II группу крови. Ученые начали с антигенов А потому, что эта группа крови встречается чаще, чем с антигеном В.

Поиски были долгими, но в конце концов ученые обнаружили, что для такой работы необходимы сразу два фермента, которые производит бактерия *Flavonifractor plautii*. Добавление совсем небольшого количества этих белков в кровь превращает II группу крови в «универсальную» I группу.

В дальнейшем планируются аналогичные работы по преобразованию эритроцитов, несущих антигены В. И конечно, нужно еще убедиться в полной безопасности этой эффективной и экономически выгодной технологии.



Rahfeld P, Sim L, Moon H, et al.

An enzymatic pathway in the human gut microbiome that converts A to universal O type blood. Nat Microbiol. 2019;4:1475-85. DOI: 10.1038/s41564-019-0469-7

Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей

А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, В.П.Мякина,
В.М.Красильникова, В.В.Верёвкин, Е.А.Ганина, Н.В.Воложанцев

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

В последние годы бактериофаги все чаще стали использовать для профилактики и лечения различных бактериальных инфекций у людей. Зачастую литические фаги оказываются единственным эффективным средством в борьбе с микроорганизмами, обладающими устойчивостью ко многим антибиотикам. Высокая специфичность бактериофагов позволяет избежать негативного влияния на микробиом человека, что делает их более привлекательными для лечения. По сравнению с антибактериальными препаратами широкого спектра действия. В нашей работе мы оценили лечебно-профилактическое действие бактериофага Рm3 на двух моделях протейной инфекции у мышей – летальном сепсисе и инфекции ожоговой раны кожи. Показано, что однократное внутрибрюшинное введение фага в дозе 10^8 БОЕ в режиме профилактики обеспечивает выживаемость 90% животных, инфицированных летальной дозой *Proteus mirabilis* M32. Курсовое лечение генерализованной протейной инфекции, начатое через 1,5 ч после инфицирования, защищало от гибели 80% мышей и было сопоставимо с антибиотикотерапией (лечебный эффект – 90%). Парентеральное и наружное применение бактериофага Рm3 для лечения протейной инфекции ожоговой раны кожи оказывало слабое терапевтическое действие, выражавшееся в снижении обсемененности клетками *P. mirabilis* M32 поверхности раны и предотвращении инвазии инфекции у части животных. Ципрофлоксацин, назначаемый в виде раствора для орошения раны или подкожно, давал выраженный лечебный результат: поверхность раны и глубокие слои кожи были санированы у 100% модельных животных, а в селезенке и почках животных культура протей отсутствовала.

Таким образом, по антибактериальной активности *in vivo* бактериофаг Рm3 оказался близок к антибиотику ципрофлоксацину, но только при профилактике и лечении протейного сепсиса. Фаг Рm3 малоэффективен при терапии ожоговой протейной инфекции. Ципрофлоксацин обладает высокой эффективностью при лечении как протейного сепсиса, так и инфекции термической раны кожи, вызываемой штаммом *P. mirabilis* M32, у мышей.

Ключевые слова: *Proteus mirabilis*, протейная инфекция, сепсис, ожоговая инфекция, мышинная модель, бактериофаг, фаготерапия, ципрофлоксацин

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Мякина В.П., Красильникова В.М., Верёвкин В.В., Ганина Е.А., Воложанцев Н.В. Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей. Бактериология. 2020; 5(1): 14–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24

Effectiveness of bacteriophage Pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice

A.I.Borzhilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, V.P.Myakinina,
V.M.Krasilnikova, V.V.Verevkin, E.A.Ganina, N.V.Volozhantsev

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

In recent years, bacteriophages have been widely used to prevent and to treat various bacterial infections in humans. Lytic phages are often the only effective tool to combat multi-antibiotic resistant microorganisms. The high specificity of the bacteriophages allows avoiding negative effects on the human microbiome, making them more therapeutically attractive compared to broad-spectrum antibacterials. In our work, we evaluated therapeutic and prophylactic effects of bacteriophage Pm3 by using two models of *Proteus*-associated infection in mice, lethal sepsis and skin burn wound infection. Our results showed that a single preventive intraperitoneal administration of the phage at 10^8 PFU saved 90% of animals infected with a lethal dose of *Proteus mirabilis* M32. The course treatment of generalized *Proteus* infection initiated 1.5 hours after infection

Для корреспонденции:

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, д. 24, территория «Квартал А», п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-01-47

E-mail: borzhilov@obolensk.org

Статья поступила 27.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

For correspondence:

Alexander I. Borzhilov, PhD (Medicine), leading researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 36-01-47

E-mail: borzhilov@obolensk.org

The article was received 27.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

protected 80% of mice from death and was comparable to antibiotic therapy (90% therapeutic effect). Parenteral and external use of bacteriophage Pm3 for treating *Proteus* infection of burns showed a weak therapeutic effect manifested as decreased contamination of the wound surface with *P. mirabilis* M32 cells and prevention of infection invasion in some animals. Ciprofloxacin applied as a wound irrigation solution or subcutaneously gave a pronounced therapeutic effect: the wound surface and deep skin layers were sanitized in 100% of cases, and *Proteus* culture in the spleen and kidneys of the animals was absent. Thus, *in vivo* antibacterial activity of bacteriophage Pm3 was close to that of ciprofloxacin, but in preventing and treating *Proteus*-associated sepsis only. The phage is low effective in treating burn *Proteus* infection. Ciprofloxacin is highly effective in treating both *Proteus*-associated sepsis and skin thermal wound infections caused by *P. mirabilis* M32 in mice.

Keywords: *Proteus mirabilis*, *Proteus* infection, sepsis, burn infection, mouse model, bacteriophage, phage therapy, ciprofloxacin

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Myakinina V.P., Krasilnikova V.M., Verevkin V.V., Ganina E.A., Volozhantsev N.V. Effectiveness of bacteriophage Pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice. *Bacteriology*. 2020; 5(1): 14–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24

Протеи представляют собой грамотрицательные аэробные полиморфные палочки, достигающие в длину не более 3 мкм. Бактерии этого вида способны вырабатывать эндотоксины и лизировать эритроциты. У штаммов *P. vulgaris* обнаружена лецитиназная активность. Кроме того, протей обладают способностью к адгезии. Например, у высокоадгезивных штаммов *P. rettgeri* на одной уроэпителиальной клетке фиксируется до 60–65 бактериальных клеток, а у низкоадгезивных штаммов *P. mirabilis* – в три раза меньше. Показано, что адгезивные свойства протей напрямую связаны с устойчивостью к фторхинолонам [1–4].

Бактерии рода *Proteus* представляют большой интерес для микробиологов и инфекционистов, так как в последнее время они становятся причиной заболеваний у человека. Что касается внутрибольничных инфекций, то наиболее часто протей обнаруживаются в гное из послеоперационных ран урологических больных и больных с трофическими язвами. Протей вызывают около 45% катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей [5–7]. Благодаря способности образовывать фермент уреазу протей формируют благоприятную среду для образования фосфатных камней в почках, возникновения некрозов почечной ткани и снижения местного иммунитета. В результате бактерии могут беспрепятственно размножаться и вызывать инфекцию мочевыводящих путей у человека [8–10]. Нередко они являются причиной сепсиса, пневмоний, инфекции ран, желудочно-кишечного тракта, менингитов [11–14]. Кишечная протейная инфекция наиболее часто протекает в виде гастроэнтерита, гастрита и колиэнтерита [15].

Клинически значимыми штаммами протей являются *P. mirabilis*, *P. rettgeri* и *P. morganii*. Реже из биологических материалов выделяют *P. vulgaris* [12, 16].

По данным некоторых авторов, по восприимчивости к антибиотикам *P. mirabilis* отличается от *P. vulgaris*. Как правило, бактерии *P. mirabilis* не чувствительны к нитрофурантоину и тетрациклину, но восприимчивы к ампициллину, амоксициллину, пиперациллину, цефалоспорином, аминогликозидам, имипенему, ципрофлоксацину и триметоприм/сульфаметоксазолу [17–19]. Чувствительность штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* к цефиксиму составляет 63 и 100%, к офлоксацину – 88 и 100%, налидиксовой кислоте – 75 и 67%, гентамицину – 75 и 67%, нитрофурантоину – 63 и 67% соответственно [20]. В других случаях чувствительность *P. mirabilis* и *P. vulgaris* была следующей: амоксициллин/клавулановая кислота – 53 и 53%, цефтриаксон –

96 и 98%, ципрофлоксацин – 96 и 95%, налидиксовая кислота – 53 и 51%, гентамицин – 72 и 71%, триметоприм/сульфаметоксазол – 48 и 46%, нитрофурантоин – 62 и 53%, тетрациклин – 47 и 46% соответственно [21]. Другие исследователи приводят данные о чувствительности штаммов *P. mirabilis* к цефтазидиму и цефотаксиму [22] и устойчивости к действию цефтриаксона [11].

Несмотря на чувствительность *P. mirabilis* к антибиотикам, описаны случаи вспышек инфекции, вызываемой штаммами, устойчивыми одновременно к ампициллину, цефалотину, тетрациклину, хлорамфениколу, карбенициллину, колистину, триметоприм/сульфаметоксазолу, стрептомицину и аминогликозидам [23]. Иногда множественная антибиотикорезистентность клинических изолятов *P. mirabilis* сочетается с устойчивостью к дезинфектантам [24].

Бактерии *P. penneri* обычно более устойчивы к пенициллину. Они, как правило, чувствительны к цефокситину, цефалоспорином широкого спектра действия (цефотаксим, цефтриаксон, цефтизоксим и цефтазидим), цефепиму, азтреонаму, аминогликозидам, ципрофлоксацину, тазобактаму и имипенему, цефепоксину, цефепозину, но устойчивы к цефоксиму [17, 19], цефамандолу, цефдиниру, цефоперазону, лоракарбефу, ампициллину и уреидопенициллинам [25]. Лечение протейной инфекции проводят с применением эффективных антибиотиков, пробиотиков, симбиотиков и бактериофагов.

Для оценки *in vivo* эффективности новых антибактериальных препаратов, направленных против бактерий рода *Proteus*, используют различные модели экспериментальной протейной инфекции: легочную инфекцию, инфекции мочевыводящих путей, сепсис, энцефалит, раневую инфекцию.

Легочную инфекцию воспроизводят на иммуносупрессивных мышах (СЗН/НеJ) и крысах, вводя им культуру *P. mirabilis* интраназально. В результате происходит бактериальная колонизация легких без возникновения клинических симптомов и гибели животных [26].

Инфекцию мочевыводящих путей (ИМП) моделируют на аутбредных мышах CD-1, которых заражают трансуретрально культурой штаммов *P. mirabilis* различного происхождения. После изучают состояние мочевого пузыря и почек, а также делают бактериологический анализ на содержание клеток *P. mirabilis* в гомогенатах этих органов [27]. Другие исследователи моделируют хронический пиелонефрит, который вызывают трансуретральным введением мышам линии CBA/J культуры клинического штамма *P. mirabilis*

в дозе 10^9 КОЕ. Высокая доза патогена вызывает гибель 35% инфицированных животных [28, 29].

Для моделирования нелетальной ИМП используют также крыс. Так, например, крысам линии Вистар (самки весом 150–180 г) инокулят культуры *P. mirabilis* (клинический изолят) в количестве 3×10^8 КОЕ вводят в мочевого пузырь, в результате чего клетки патогена колонизируют почки животных и сохраняются в них в течение 8 недель, вызывая гистологические и физиологические изменения, которые приводят впоследствии к хроническому пиелонефриту [30].

Описана модель микст-инфекции (*Pseudomonas aeruginosa* / *Proteus mirabilis*), вызывающей менингоэнцефалит у белых мышей. Подопытных животных заражают путем внутривенного введения культур. Гибель мышей наступает в связи с развитием сепсиса и полиорганной недостаточности [31].

Раневую протейную инфекцию вызывают путем инфицирования культурой *P. mirabilis* скальпированной [32] или термической раны у мышей [33]. Заражающая доза патогена составляет 10^7 – 10^8 КОЕ. Подобное инфицирование может приводить к гибели до 80–100% экспериментальных животных. В процессе развития инфекции исследуют обсемененность раны клетками патогена.

Острый протейный сепсис у аутбредных мышей воспроизводят внутрибрюшинным заражением культурой *P. vulgaris* в дозе 10^7 КОЕ. Учитывая низкую вирулентность штаммов протей для мышей, бактериальную суспензию вводят с раствором 5%-го желудочного муцина, что повышает чувствительность животных к данному возбудителю [34].

При внутривенной инъекции взвеси клеток *P. mirabilis* (2×10^8 КОЕ) мышам BALB/c гибель может достигать 16%, при этом образование почечных камней не наблюдается [35].

Цель исследования – сравнительное изучение антибактериальной активности *in vivo* бактериофага Pm3 и ципрофлоксацина на моделях летального сепсиса и инфекции ожоговой раны кожи у мышей, вызываемых *P. mirabilis* M32.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Для моделирования экспериментальной протейной инфекции использовали культуру клинического штамма *P. mirabilis* M32 (кат. № В-7522) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболонск». Штамм обладает чувствительностью *in vitro* к цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, амикацину, имипенему, ампициллину, гентамицину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу. *P. mirabilis* M32 имеет промежуточную чувствительность к доксициклину.

Питательные среды, антибиотики

Для приготовления взвеси для заражения животных культуру протей выращивали на плотной питательной среде № 1 ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия). В качестве селективной среды, предотвращающей «роение» колоний, использовали среду XLD-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Жидкую питательную среду Luria Bertoni Broth (HiMedia, Индия) использовали для получения фаголизатов.

В качестве контрольного антибиотика в экспериментах по лечению применяли ципрофлоксацин (ICN, США).

Выделение бактериофага Pm3

Очищенный препарат бактериофага Pm3 готовили из лизата бульонной культуры штамма *Proteus mirabilis* M32. Культуру *P. mirabilis* M32 выращивали в LB-бульоне при температуре 37°C. Затем добавляли бактериофаг в соотношении 1:10 и продолжали инкубировать культуру до полного просветления. В фаголизат вносили хлористый натрий до концентрации 1М (29,2 г на 500 мл). Инкубировали 2 ч в водяной бане при температуре 0°C. Примеси осаждали с помощью центрифугирования при 15000 g в течение 10 мин при температуре 4°C.

В супернатант вносили полиэтиленгликоль (ПЭГ 8000) до концентрации 10%. Инкубировали 2 ч в водяной бане при температуре 0°C. Бактериофаг осаждали центрифугированием при 39000g в течение 10 мин при температуре 4°C. Осадок основательно высушивали при комнатной температуре, затем суспендировали в физиологическом растворе. Титр фаговых частиц в препарате определяли методом Грациа.

Выделенные бактериофаги не обладали токсическим действием на мышей при внутрибрюшинном введении в дозе 5×10^8 БОЕ в 0,5 мл (данные не приводятся).

Лабораторные животные

В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали белых аутбредных (беспородных) мышей (самцы/самки, 20–25 г) и мышей линии BALB/c (самцы/самки, 18–22 г), выращенных в питомнике ФБУН ГНЦ ПМБ.

Протейную инфекцию моделировали на здоровых мышах и на мышах с индуцированным иммунодефицитом. Иммуносупрессию у мышей вызывали одновременным внутрибрюшинным введением 5%-го муцина с культурой *P. mirabilis* M32.

Модельных животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва).

Мышей размещали в поликарбонатных клетках «Lab Products Inc.» (США) группами не более шести животных в каждой и проводили за ними ежедневное ветеринарное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток незамедлительно.

Приготовление бактериальных культур для заражения

Бактериальную суспензию для заражения мышей готовили из агаровой культуры *P. mirabilis* M32, доводя мутность до 5,0 единиц по МакФарланду, для моделирования раневой инфекции, что приблизительно соответствует $2,6 \times 10^9$ КОЕ/мл. Для внутрибрюшинного заражения делали суспензию с мутностью 4,7 по МакФарланду (2×10^9 КОЕ/мл), а затем разводили ее физиологическим раствором до нужной концентрации. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем высева по 0,1 мл из соответствующих разведений приготовленной суспензии на плотную питательную среду XLD. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C.

Моделирование летального протейного сепсиса у мышей

Летальный сепсис моделировали на мышах линии BALB/c, вводя им внутрибрюшинно культуру *P. mirabilis* M32 в дозе 6×10^7 КОЕ, что составляло приблизительно 100 ЛД₅₀. Перед

заражением культуру патогена разводили 1:1 с 5%-м муцином (Sigma, США).

Моделирование инфицированной ожоговой раны кожи

Термические раны у мышей получали методом, описанным Liyi Huang [33]. В качестве модельных животных использовали аутбредных (нелинейных) мышей. За сутки до нанесения ожога у животных выбривали участок кожи на спине размером 2 × 2 см и дополнительно обрабатывали кремом-депилятором для лучшего удаления шерсти. Подопытных мышей перед нанесением ожога анестезировали с помощью подкожной инъекции смеси золетила с ксилазином. Ожог вызывали разогретыми до температуры 100°C металлическими пластинами. Приподнятую складку кожи на спине зажимали разогретыми пластинами на 60 с, в результате у животных формировался ожог 3-й степени. Общая площадь ожога составляла 2 см², что соответствует 5% от общей площади поверхности тела. Незамедлительно после нанесения термической раны мышам внутрибрюшинно вводили 0,5 мл стерильного физиологического раствора.

Через 5 мин после нанесения ожога рану заражали культурой *P. mirabilis* M32. Для этого на место ожога наносили 0,04 мл бактериальной взвеси с концентрацией $2,6 \times 10^9$ КОЕ/мл, распределяя ее на поверхности, равной 2 см². Таким образом, заражающая доза патогена составляет 1×10^8 КОЕ/мышь. Через 5–7 мин инфицированную рану покрывали марлевым тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором (0,85% NaCl), и фиксировали биндом (эластичным бинтом) вокруг тела мыши.

Изучение динамики развития инфекции раны

Динамику развития протейной инфекции кожных покровов изучали на 30 аутбредных мышах, которых заражали накожно культурой *P. mirabilis* M32 (1×10^8 КОЕ) и следили за формированием гнойной раны на коже. Через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч контролировали степень обсемененности поверхности раны клетками *P. mirabilis* M32, делая смывы с поверхности раны у пяти мышей. Этих же животных подвергали эвтаназии и иссекали кожный лоскут с ожоговой инфицированной раной, а также отбирали селезенку и кровь для выявления бактерий *P. mirabilis* M32.

Смывы с поверхности кожи

Смывы с поверхности инфицированной раны кожи у мышей делали с помощью стерильного ватного тампона, пропитанного физиологическим раствором, проводя по ее поверхности 5–6 раз. После этого тампон погружали в микроцентрифужную пробирку с 0,5 мл физиологического раствора и тщательно перемешивали. Образцы смывов титровали методом последовательных разведений в физиологическом растворе, высевали на плотную питательную среду и выдерживали в течение ночи при температуре 37°C.

Бактериологический анализ биологических образцов

Животных эвтаназировали углекислым газом или методом декапитации, а затем после констатации смерти вскрывали для получения образцов органов и крови. Селезенку, почки и кожный лоскут перетирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенизаты добавляли стерильный физиологический раствор (1 мл) и перемешивали до получения однородной суспензии. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения)

высеивали на поверхность питательного агара. В качестве питательной среды для выявления культуры синегнойной палочки использовали XLD-агар. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч.

Гистологическое исследование раны кожи

После эвтаназии у животных иссекали участок кожи с местом ожога. Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали срезы кожи, проходящие через участок ожоговой раны. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в различных слоях кожи и подкожной клетчатки.

Лечение экспериментального протейного сепсиса

Мышей линии BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *P. mirabilis* M32, случайным образом распределяли на пять экспериментальных и одну контрольную группы по десять особей в каждой. Животным из первой экспериментальной группы за час до заражения давали однократно фаг Рm3 (внутрибрюшинно, 5×10^8 БОЕ в 0,5 мл) – группа профилактики. Мышам из второй группы вводили бактериофаг в той же дозе через 1,5 ч после заражения 2 раза в день с интервалом 8 ч в течение 5 дней. Третью, четвертую и пятую группы мышей лечили по той же схеме, но ципрофлоксацином. Разовая терапевтическая доза антибиотика составляла соответственно 25, 50 и 100 мг/кг внутривенно.

Наблюдение за животными вели в течение 14 дней с момента заражения, отмечая случаи гибели животных. В конце указанного срока выживших мышей исследовали на носительство бактерий *P. mirabilis* M32.

Лечение протейной инфекции ожоговой раны

Беспородных белых мышей с инфицированным термическим ожогом кожи делили на четыре лечебные (по пять животных в каждой) и контрольную группу (семь мышей). Через 24 ч после заражения мышей начинали лечить бактериофагом Рm3 или ципрофлоксацином. Лечение продолжали в течение двух дней. Мышам из группы № 1 назначали бактериофаг в дозе 5×10^8 БОЕ накожно (орошение раны 0,04 мл). Экспериментальной группе № 2 Рm3 вводили два раза в день в той же разовой дозе в объеме 0,5 мл. Животным из группы № 3 рану орошали дважды в день 0,04 мл раствора ципрофлоксацина (15 мг/мл), а животным из группы № 4 антибиотик вводили подкожно в объеме 0,2 мл в дозе 100 мг/кг дважды в день. Группа № 5 являлась контрольной и не получала никаких антибактериальных препаратов.

На третьи сутки после заражения животных эвтаназировали и определяли обсемененность клетками протей поверхности раны, кожного лоскута в месте ожога и ткани селезенки. В крови клетки возбудителя не определяли, так как в предварительных экспериментах было установлено, что бактериемия у животных не развивается.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов (вычисление средних арифметических значений и стандартного отклонения) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2010 и статистической программы Statistica 10.

Результаты и обсуждение

Развитие летального протейного сепсиса у мышей

Изучение динамики развития протейного сепсиса у мышей линии BALB/c, обусловленного внутрибрюшинным введением 6×10^7 КОЕ культуры *P. mirabilis* M32, показало, что у животных происходит стремительная генерализация инфекции (табл. 1). Уже через 1,5 ч после заражения у животных среднее количество клеток протей в селезенке мышей составляло $6,55 \pm 0,1$ LOG₁₀ КОЕ/г, а затем возрастало до $8,40 \pm 0,11$ LOG₁₀ КОЕ/г (12 ч). В тот же период времени концентрация клеток *P. mirabilis* M32 в почках увеличивалась с $5,46 \pm 0,29$ до $7,65 \pm 0,25$ LOG₁₀ КОЕ/г. У мышей наблюдалась выраженная бактериемия ($5,32 \pm 0,22$ LOG₁₀ КОЕ/мл) на ранней стадии инфекции, через двенадцать часов достигавшая критических значений – $7,77 \pm 0,18$ LOG₁₀ КОЕ/мл. Генерализация протейной инфекции приводила к быстрой гибели животных. Через сутки после заражения все мыши умирали, а из их органов высевалась культура патогена – *P. mirabilis* M32.

Эффективность лечения летального протейного сепсиса у мышей

Результаты экспериментального лечения летального протейного сепсиса у мышей показали высокую антибактериальную активность *in vivo* бактериофага Рm3. Однократное введение фагового препарата в количестве 1×10^8 БОЕ в режиме профилактики за час до заражения культурой *P. mirabilis* M32 способствовало выживанию 90% животных (рис. 1). В то же время все мыши из контрольной группы (без лечения) умирали от инфекции в течение 24 ч после заражения. Пятидневная фаготерапия, начатая через 1,5 ч после инфицирования, защищала от гибели 80% животных в течение 14 дней наблюдения. Все животные, выжившие после фаготерапии, оказались свободными от бактерий *P. mirabilis* M32. Бактериологический анализ внутренних органов и крови эвтаназированных

Таблица 1. Динамика обсемененности клетками *P. mirabilis* M32 селезенки, почек и крови мышей линии BALB/c после внутрибрюшинного заражения в дозе 100 ЛД₅₀

Время после заражения, ч	Среднее количество клеток <i>P. mirabilis</i> M32, LOG ₁₀ КОЕ в 1 г (мл)		
	Селезенка	Почки	Кровь
1,5	$6,55 \pm 0,19$	$5,46 \pm 0,29$	$5,32 \pm 0,22$
3	$6,49 \pm 0,25$	$5,81 \pm 0,24$	$5,85 \pm 0,43$
6	$7,85 \pm 0,25$	$7,39 \pm 0,11$	$6,99 \pm 0,34$
12	$8,40 \pm 0,11$	$7,65 \pm 0,25$	$7,77 \pm 0,18$

Примечание: представлены средние значения ($n = 5$) и стандартные отклонения.

мышей из этих групп показал отсутствие в образцах клеток патогена.

Лечебная эффективность ципрофлоксацина напрямую зависела от его разовой дозы. Пятидневная терапия экспериментальной протейной инфекции ципрофлоксацином в дозах 25 и 50 мг/кг способствовала выживанию не более 30% мышей. Введение антибиотика в разовой дозе 100 мг/кг обеспечивало 90%-й лечебный эффект. Все выжившие в течение 14 дней мыши не являлись носителями бактерий *P. mirabilis* M32.

Таким образом, в экспериментах по профилактике и лечению генерализованной летальной протейной инфекции установлено, что бактериофаг Рm3 по своей лечебной эффективности не уступает антибиотику ципрофлоксацину.

Развитие протейной инфекции ожоговой раны кожи у мышей

В качестве второй модели для оценки специфической активности фага Рm3 была использована модель протейной инфекции термической раны кожи. Термическую рану инфицировали культурой *P. mirabilis* M32 в дозе 1×10^8 КОЕ. Через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч проводили анализ обсемененности поверхности раны, кожного лоскута с местом ожога и селезенки эвтаназированных мышей.

Результаты бактериологического анализа смывов с поверхности инфицированной раны у мышей показали, что в период с 3 до 24 ч после заражения концентрация клеток *P. mirabilis* M32 возрастала с $5,28 \pm 0,26$ до $6,17 \pm 0,70$ LOG₁₀ КОЕ/см², а в последующие часы снижалась до $4,66 \pm 1,33$ LOG₁₀ КОЕ/мл (табл. 2). В кожном лоскуте в течение двух суток после инфицирования содержание клеток патогена увеличивалось с $5,55 \pm 0,55$ до $8,58 \pm 0,33$ LOG₁₀ КОЕ/г, а через три дня оставалось на том же уровне.

В ходе исследования было установлено, что бактерии *P. mirabilis* M32 способны диссеминировать из ожоговой раны кожи во внутренние органы мыши. Так, например, в первые три часа инфекции возбудитель выделили из селезенки у 2 из 5 мышей (40%). Средняя обсемененность органа оказалась невысокой и составила $2,52 \pm 1,01$ LOG₁₀ КОЕ/г. Через 48 ч селезенка была инфильтрирована клетками протей у всех инфицированных мышей, а средний уровень обсемененности составил $3,53 \pm 1,18$ LOG₁₀ КОЕ/г. Максимальная концентрация бактерий *P. mirabilis* M32 в ткани селезенки была выявлена через 24 ч после заражения – $4,33 \pm 1,21$ LOG₁₀ КОЕ/г.

Бактериологический анализ крови животных, инфицированных *P. mirabilis* M32, показал отсутствие бактериемии на протяжении всего срока наблюдения (72 ч).

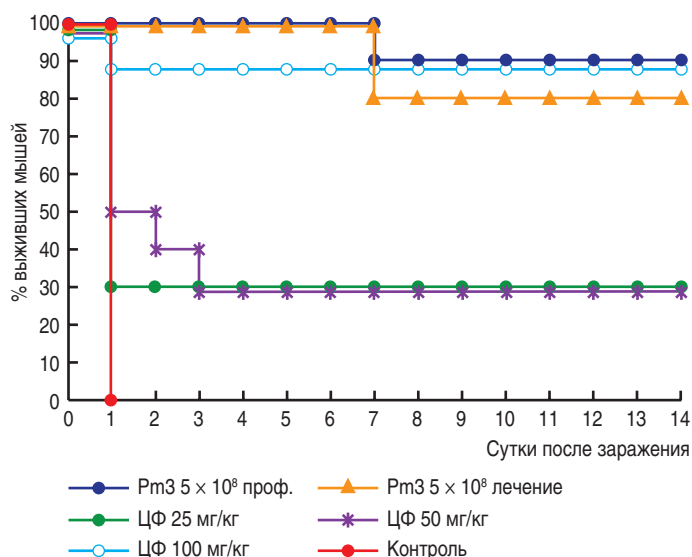


Рис. 1. Терапевтическая эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина (ЦФ) при профилактике и лечении летальной инфекции, вызываемой внутрибрюшинным заражением мышей линии BALB/c культурой *P. mirabilis* M32 в дозе 100 ЛД₅₀.

Таблица 2. Содержание бактерий *Proteus mirabilis* M32 в органах и тканях нелетальных мышей, инфицированных накожно дозой 1×10^8 КОЕ

Время после заражения, ч	Среднее количество клеток <i>P. mirabilis</i> M32, LOG10 КОЕ/г (мл)			
	Смывы*	Кожный лоскут	Селезенка	Кровь
3	5,28 ± 0,26 (5/5)	5,55 ± 0,55 (5/5)	2,52 ± 1,01 (2/5)	<1,11 (5/5)
6	5,20 ± 0,24 (5/5)	6,50 ± 0,91 (5/5)	2,46 ± 0,96 (5/5)	<1,11 (5/5)
12	5,86 ± 0,44 (5/5)	6,84 ± 1,19 (5/5)	2,84 ± 0,18 (5/5)	<1,11 (5/5)
24	6,17 ± 0,70 (5/5)	8,43 ± 1,13 (5/5)	4,33 ± 1,21 (5/5)	<1,11 (5/5)
48	4,25 ± 1,55 (5/5)	8,58 ± 0,33 (5/5)	3,53 ± 1,18 (5/5)	<1,11 (5/5)
72	4,66 ± 1,33 (5/5)	8,20 ± 0,78 (5/5)	2,69 ± 0,68 (4/5)	<1,11 (5/5)

Примечание: в скобках указано соотношение количества животных с положительным бактериологическим ответом к общему числу животных в группе;

* – КОЕ/см².

Таблица 3. Антибактериальная эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении термической раны кожи у золотистых хомячков, инфицированной *P. mirabilis* M32

Группы		Среднее количество клеток <i>P. mirabilis</i> M32, LOG10 КОЕ/г (мл)		
		Селезенка	Кожный лоскут	Смывы
1	Рm3, накожно	2,72 ± 0,44 (2/5)	7,32 ± 0,73 (5/5)	2,60 (1/5)
2	Рm3, в/бр	3,77 ± 1,46 (4/5)	7,76 ± 0,68 (5/5)	4,05 ± 0,57 (4/5)
3	Ципрофлоксацин, накожно	<1 (5/5)	<1 (5/5)	<1,3 (5/5)
4	Ципрофлоксацин, п/к	<1 (5/5)	<1 (5/5)	<1,3 (5/5)
5	Контроль	2,71 ± 0,57 (4/7)	8,37 ± 0,87 (7/7)	4,86 ± 0,83 (7/7)

Примечание: среднее значение и стандартное отклонение; в числителе указано количество мышей – носителей *P. mirabilis* M32, а в знаменателе – количество мышей в группе.

При микроскопическом исследовании гистологических срезов кожи, поврежденной ожогом и инфицированной культурой *P. mirabilis* M32, были выявлены значительные патологические изменения, в том числе некротического характера (рис. 2).

В коже отсутствовали наружные слои – эпидермис и верхний слой дермы. Выраженный отек охватывает всю толщу кожи, подкожную ткань и подлежащий слой скелетных мышц (1). Хорошо виден слой дермы с волосными фолликулами, которые в большом количестве видны вдоль поверхности среза кожи. В дерме имеется множество полнокровных капилляров, что свидетельствует о наличии гемоциркуляции. Микробные клетки диффузно располагаются по всей толщине верхнего слоя ожоговой раны. Ниже имеется базофильно окрашенный слой, представляющий собой плотное скопление микробных клеток в рыхлой соединительной ткани дермы (2). В ниже расположенных слоях (мышцах кожи, подкожной соединительной ткани) микробные клетки отсутствуют. В различных слоях дермы и в подкожной ткани имеется множество разрушенных полиморфноядерных лейкоцитов (3), а также некоторое количество лимфоцитов и моноцитов. Такого же клеточного состава инфильтрат наблюдается в соединительной ткани между мышечными волокнами скелетных мышц (5).

Эффективность лечения протейной инфекции ожоговой раны у мышей

Результаты лечения протейной ожоговой инфекции показали, что использованная нами модель пригодна для оценки эффективности антибактериальных препаратов. Животные, которым инфицированную ожоговую рану орошали раствором ципрофлоксацина (группа № 3) или вводили антибиотик подкожно (группа № 4), на третьи сутки после начала терапии полностью излечивались от протейной инфекции. В обеих лечебных группах с поверхности раны, из кожного лоскута и селезенки выделить культуру *P. mirabilis* M32 не

удалось (табл. 3). В то же время среднее количество клеток протей в смывах, в кожном лоскуте и селезенке у контрольных животных составляло $4,86 \pm 0,83$; $78,37 \pm 0,87$ и $2,71 \pm 0,57$ КОЕ/г соответственно.

Фаготерапия протейной инфекции кожи оказалась менее эффективной по сравнению с антибиотикотерапией. Через 72 ч после наружного применения фагового препарата только у одной из пяти мышей культура *P. mirabilis* M32 присутствовала в смывах с поверхности раны. При этом концентрация патогена в смывных водах составила 4×10^2 КОЕ/мл, что в 600 раз меньше, чем у контрольных животных ($4,86 \pm 0,83$ LOG10 КОЕ/см²). В кожном лоскуте патоген был обнаружен у 100% мышей, при этом среднее количество клеток *P. mirabilis* M32 достигало $7,32 \pm 0,73$ LOG10 КОЕ/г и было в пятнадцать раз меньше, чем у нелеченых мышей.

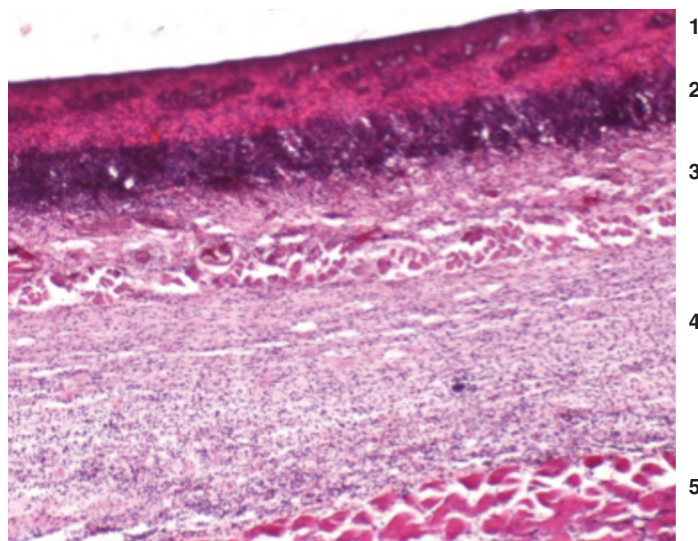


Рис. 2. Микрофотография среза кожи мыши, сделанная через 24 ч после нанесения термического ожога и инфицирования культурой *P. mirabilis* M32.

Почти у половины леченных фагом животных патоген оставался в селезенке ($2,72 \pm 0,44$ КОЕ/г).

При внутрибрюшинном способе введения бактериофага результаты лечения инфицированной раны были хуже. Только у одной из пяти мышей культура протей отсутствовала в смывных водах и селезенке. Однако обсемененность клетками *P. mirabilis* M32 поверхности раны и кожного лоскута мышей из группы № 4 была, соответственно, в двенадцать и пять раз ниже по сравнению с контролем. Селезенка оказалась инфицированной у четырех животных из пяти. Среднее количество клеток протей в 1 г органа составляло $3,77 \pm 1,46$ LOG₁₀ КОЕ/г, что даже превышало этот показатель в контрольной группе.

Таким образом, двухдневное лечение экспериментальной протейной инфекции термической раны кожи у мышей показало невысокую эффективность бактериофага Pm3 как при наружном (орошение раны), так и при парентеральном способе применения. Ципрофлоксацин предотвращал диссеминацию клеток *P. mirabilis* M32 в организме мышей и приводил к полной санации раны кожи (поверхности и глубоких слоев). Следует отметить, что антибиотик был активен при наружном и парентеральном способах применения.

Для сравнительного изучения терапевтической активности бактериофага Pm3 и ципрофлоксацина были использованы две модели протейной инфекции, так как *P. mirabilis* способен вызывать различные нозологические формы инфекции у человека. Генерализованная протейная инфекция приводит к быстрой гибели экспериментальных животных. Эта особенность инфекции позволяет наглядно оценить активность *in vivo* различных антимикробных препаратов по показателю выживаемости модельных животных. Нелетальную модель протейной инфекции термической раны кожи у здоровых аутобредных белых мышей мы использовали для оценки активности антибактериальных препаратов при наружном применении. Предварительные исследования показали, что культура *P. mirabilis* M32 хорошо приживается в ожоговой ране кожи 3-й степени, а максимальная концентрация патогена в ране наблюдается через 72 ч после заражения.

В качестве возбудителя протейной инфекции использовали наиболее вирулентный клинический штамм *P. mirabilis* M32 из коллекции «ГКПМ-Оболенск». Для воспроизведения генерализованной инфекции мышей линии BALB/c заражали культурой протей в дозе 6×10^7 КОЕ в растворе муцина. Муцин повышает вирулентность бактериальных штаммов при внутрибрюшинном введении, препятствуя лизису клеток в макрофагах [36]. Среднелетальная доза использованного штамма при таком способе заражения была равной 6×10^5 КОЕ. Таким образом, заражающая доза патогена составила около 100 ЛД₅₀. Муцин позволяет повысить восприимчивость животных к *P. mirabilis* M32, так как подавляет активность перитонеальных макрофагов.

Для лечения летального протейного сепсиса мы использовали бактериофаг Pm3, который активно лизирует *in vitro* клетки *P. mirabilis* M32. Оказалось, что фаг, назначаемый внутрибрюшинно однократно в дозе 5×10^8 БОЕ за час до заражения (режим профилактики), способствует выживанию 90% мышей. Об эффективности профилактической фаготерапии свидетельствует и тот факт, что все выжившие мыши не являлись носителями *P. mirabilis* M32. Ранее нами

была показана высокая эффективность профилактической фаготерапии летальной септической инфекции у мышей, вызываемой бактериями других видов – *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* [37–39]. Следует отметить, что терапевтическая доза использованных бактериофагов (SA18, KpV289, PA5) составляла 5×10^8 – 5×10^9 БОЕ, а защитный эффект наблюдался в 80–100% случаев.

Применение бактериофага Pm3 в режиме лечения (начало терапии через 1,5 ч) дало близкие результаты к профилактике (выживаемость 80%). При этом у всех выживших мышей произошла полная элиминация возбудителя. Кроме того, по своей эффективности фаготерапия была на уровне антибиотикотерапии, которая дала положительный терапевтический эффект в 90% случаев. Следует отметить, что ципрофлоксацин оказался эффективным при лечении протейного сепсиса только в максимальной разовой дозе (100 мг/кг), которая соответствует разовой терапевтической дозе антибиотика для человека.

Несмотря на высокую активность бактериофага Pm3 при лечении генерализованной протейной инфекции у мышей, он оказался малоэффективен при лечении ожоговой инфекции, обусловленной штаммом *P. mirabilis* M32. При местном применении Pm3 через 24 ч после инфицирования он санировал поверхность раны у 4 из 5 мышей. Таким образом, бактериофаг успешно лизировал бактерии *P. mirabilis* M32, которые размножались на поверхности раны, образуя, возможно, биопленки. Экспериментально доказано, что протейные бактериофаги способны эффективно разрушать кристаллические биопленки, формируемые протеом [40, 41]. В то же время, несмотря на двухдневную аппликацию раны препаратом бактериофага Pm3, он не смог лизировать клетки протей, находившиеся в глубоких слоях кожи, о чем свидетельствовала высокая обсемененность протеом кожного лоскута. Низкий терапевтический эффект был, скорее всего, связан с плохой проницаемостью кожных тканей для фаговых частиц при наружном способе применения. Тем не менее местное применение фагов при лечении ожоговой инфекции способно давать хорошие результаты. По данным Kumari S. [42], бактериофаг Kpn5 в составе гидрогеля при однократном нанесении на поверхность раны, инфицированной вирулентным штаммом *K. pneumoniae*, защищал от гибели 63,33% мышей в течение недели, в то время как при ежедневном орошении раны раствором гентамицина (1 мг/мл) выживаемость животных составляла 53,3%. Однако авторы не исследовали остаточную обсемененность клетками патогена места ожога, что не позволяет судить о степени санации инфицированной раны. Таким образом, можно говорить о том, что фаг Kpn5 воспрепятствовал развитию генерализованной инфекции, источником которой служила инфицированная рана.

Внутрибрюшинное введение бактериофага Pm3 практически не приводило к эрадикации клеток протей с поверхности и глубоких слоев кожи в месте ожога. В своих исследованиях Kumari S. et al. [42, 43] установили, что литические клебсиеллезные фаги могут быть эффективными при лечении летальной ожоговой инфекции кожи у мышей. Используемые ими для лечения бактериофаги в отдельности и в виде коктейля достоверно снижали уровень обсемененности клетками *K. pneumoniae* B5055 кожного лоскута (ожого-

вой раны 3-й степени) и паренхиматозных органов, но не санировали полностью ни одного подопытного животного. С другой стороны, однократное внутрибрюшинное введение фаговых препаратов предотвращало гибель 100% мышей. В литературе описаны стафилококковые и псевдомонадные бактериофаги с более высокими инвазивными свойствами, способные активно проникать в ожоговую рану после однократного парентерального введения и полностью элиминировать из нее возбудителя инфекции [44, 45].

Заключение

Бактериофаг Рm3 обладает высокой активностью при профилактике и лечении летального сепсиса у мышей, вызванного внутрибрюшинным введением культуры клинического штамма *P. mirabilis* M32. Защитное действие фага не уступает по своей эффективности антибиотику ципрофлоксацину в терапевтической дозе 100 мг/кг. Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное введение мышам линии BALB/c фага Рm3 (5×10^8 БОЕ) в режиме профилактики (за один час до заражения), защищает от гибели 90% животных, которые в результате терапии полностью излечиваются от протейной инфекции. Пятидневный курс фаготерапии, начатый через 1,5 ч после заражения, защищает от гибели и saniрует 80% мышей.

Пятидневное лечение экспериментального протейного сепсиса ципрофлоксацином в разовой дозе 100 мг/кг дает 90%-й лечебный результат.

Бактериофаг Рm3 оказывает незначительное saniрующее действие при лечении протейной инфекции ожоговой раны кожи у мышей. Орошение раны препаратом фага в течение 2 дней приводит к некоторому снижению ее обсемененности клетками *P. mirabilis* M32, но не предотвращает инвазию инфекции.

Обработка раны раствором ципрофлоксацина или его парентеральное введение способствует не только санации раны кожи, но и защищает организм мышей от генерализации инфекции.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Артюшенко ИИ, Коновалова ВС. Острые кишечные заболевания протейной этиологии у детей. Кишечные инфекции. 1987;19:70-73.
2. Габидулин ЗГ, Жукова РА, Батыршин СЛ. Энтеротоксигенная способность гемолизинпродуцирующих штаммов протеев, выделенных при острых кишечных инфекциях у детей. Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии. 1990;8:49-53.

3. Гуйда ОГ, Чайка НА. Протейная кишечная инфекция. Острые кишечные инфекции. 1990;131-132.
4. Хмелевская ГВ, Девтерова ЛВ, Шпелев АП, Мартиненко АД. Факторы патогенности некоторых условно-патогенных бактерий, вызывающих диарею. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1990;4:97-102.
5. Warren JW, Tenney JH, Hoopes JM, Muncie HL, Anthony WC. A Prospective Microbiologic Study of Bacteriuria in Patients with Chronic Indwelling Urethral Catheters. Journal of Infectious Diseases. 1982; 146(6):719-723.
6. Mobley HLT, Warren JW. Urease-Positive Bacteriuria and Obstruction of Long-Term Urinary Catheters. Journal of Clinical Microbiology. 1987;25(11):2216-2217.
7. Breitenbucher RB. Bacterial changes in the urine samples of patients with long-term indwelling catheters. Archive International Medicine. 1984;144(8):1585-1588.
8. Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nature Clinical Practice. Urology. 2008 Nov;5(11):598-608. DOI: 10.1038/ncpuro1231
9. Griffith DP, Musher DM, Itin C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. Investigative Urology. 1976;13(5):346-350.
10. Jones BD, Mobley HLT. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. Infection Immunity. 1987;55(9):2198-2203.
11. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Review. 2008;21(1):26-59. DOI: 10.1128/CMR.00019-07
12. Nicolle LE. Catheter-Related Urinary Tract Infection. Drugs Aging. 2005;22(8): 627-39. DOI: 10.2165/00002512-200522080-00001
13. Armbruster CE, Prenovost K, Mobley HLT, Mody L. Often Do Clinically Diagnosed Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Nursing Home Residents Meet Standardized Criteria. Journal of the American Geriatrics Society. 2017 Feb; 65(2):395-401. DOI: 10.1111/jgs.14533
14. Liassine N, Madec S, Ninet B, Metral C, Fouchereau-Peron M, Labia R, Auckenthaler R. Postneurosurgical Meningitis Due to *Proteus penneri* with Selection of a Ceftriaxone-Resistant Isolate: Analysis of Chromosomal Class A - Lactamase HugA and its LysR-Type Regulatory Protein HugR. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2002;46(1):216-219. DOI: 10.1128/AAC.46.1.216-219.2002
15. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Review. 2008 Jan;21(1):26-59. DOI: 10.1128/CMR.00019-07
16. Mobley HLT. Virulence of *Proteus mirabilis*. Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. Washington, ASM Press. 1996. P. 245-265.
17. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Survey of antimicrobial activity of four commonly used third generation cephalosporins tested against recent bacterial isolates from ten American medical centers, and assessment of disk diffusion test performance. Diagnostic Microbiology Infection Diseases. 1996;24:213-219.
18. Thornsberry C, Yee C. Comparative activity of eight antimicrobial agents against clinical bacterial isolates from the United States, measured by two methods. American Journal Medicine. 1998;(6A):26S-38S.
19. Yao JDC, Moellering RC Jr. Antibacterial agents. (ed. by P.R. Murray). Manual of clinical microbiology (7th edition). Washington: ASM Press, 1999. P.1474-1504.
20. Kehinde A, Adedapo K, Aimakhu, C. Odukogbe AT, Olayemi O, Salako B. Urinary pathogens and drug susceptibility patterns of urinary tract infections among antenatal clinic attendees in Ibadan. Journal Obstetrics Gynecology Research. 2012;38(1):280-284. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2011.01635.x
21. Nwadioha SI, Nwokedi EE, Jombo GTA, Kashibu E, Alao OO. Antibiotics susceptibility pattern of uropathogenic bacterial isolates from community- and hospital-acquired urinary tract infections in a Nigerian tertiary hospital. Internet Journal Infectious Diseases. 2010;8(1). DOI: 10.5580/14f7
22. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -Lactamases Responsible for Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins

- in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1998;42(6):1350-1354.
23. Chow AW, Taylor PR, Yoshikawa TT, Guze LB. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. Journal Infectious Diseases. 1979;139:621-627.
24. Dance DAB, Pearson AD, Seal DV, Lowes JA. A hospital outbreak caused by a chlorhexidine- and antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. Journal Hospital Infection. 1987;10(1):10-16.
25. Biedenbach DJ, Jones RN. Predictive accuracy of disk diffusion test for *Proteus vulgaris* and *Providencia* species against five newer orally administered cephalosporins, cefdinir, cefetamet, cefprozil, cefuroxime, and loracarbef. Journal Clinical Microbiology. 1994;32(2):559-562.
26. Charles River international Inc. *Proteus mirabilis*. Technical Sheet. <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/ProteusmirabilisTechnicalSheet.pdf>
27. Sosa V, Schlapp G, Zunino P. *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. Microbiology. 2006;152(7):2149-2157.
28. Li X, Lockatell CV, Johnson DE, Lane MC, Warren JW, Mobley HLT. Development of an Intranasal Vaccine To Prevent Urinary Tract Infection by *Proteus*. Infection Immunity. 2004;72(1):66-75.
29. Johanson DE, Russel RG, Lockatell CV, Zulty JC, Warren JW, Mobley HLT. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending *Proteus mirabilis*. Infect Immun. 1993;61(7):2748-2754.
30. Al-Ani IM, Al-Murayati HY, Salman MO, Ghani HM. Histological findings of ascending urinary tract infections in experimental rats caused by *Proteus mirabilis*. Biomedical Research. 2011;22(4):425-430.
31. Гехтман АБ. Протективные свойства стафило-протейно-синегнойной вакцины на экспериментальной модели внутримозговой инфекции: Экспериментальное исследование. Автореферат дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.27. Уфа, 2006, 22 с.
32. Lu Z, Dai T, Huang L, Kurup DB, Tegos GP, Jahnke A, Wharton T, Hamblin MR. Photodynamic therapy with a cationic functionalized fullerene rescues mice from fatal wound infections. Nanomedicine. 2010 Dec;5(10):1525-33. DOI: 10.2217/nnm.10.98
33. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic Combination of Chitosan Acetate with Nanoparticle Silver as a Topical Antimicrobial: Efficacy against Bacterial Burn Infections. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2011 Jul; 55(7):3432-8. DOI: 10.1128/AAC.01803-10
34. Ikeda Y, Fukuoka Y, Motomura K, Yasuda T, Nishino T. Paradoxical Activity of 1-Lactam Antibiotics against *Proteus vulgaris* in Experimental Infection in Mice. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1990;34(1):94-97.
35. Moayeri N, Collins CM, O'Hanley P. Efficacy of a *Proteus mirabilis* outer membrane protein vaccine in preventing experimental *Proteus* pyelonephritis in a BALB/c mouse model. Infection Immunity. 1991;59(10):3778-3786.
36. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. Biol Res. 1993;26:371-380.
37. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Абаев ИВ. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. Инфекция и иммунитет. 2017;S:906.
38. Борзилов АИ, Мякина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB_Kpnp_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей. Бактериология. 2017;2(1):73-77.
39. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
40. Melo LDR, Veiga P, Cerca N, Kropinski AM, Almeida C, Azeredo J, and Sanna Sillankorva. Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-associated Urinary Tract Infections. Front Microbiol. 2016 Jun 28;7:1024. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01024
41. Carson L, Gorman SP, Gilmore BF. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 Aug;59(3):447-55. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00696.x
42. Kumari S, Kusum H, Sanjay C. Efficacy of Bacteriophage Treatment in Murine Burn Wound Infection Induced by *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol Biotechnol. 2009 Jun;19(6):622-8. DOI: 10.4014/jmb.0808.493
43. Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. J Med Microbiol. 2011 Feb;60(Pt 2):205-210. DOI: 10.1099/jmm.0.018580-0
44. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda, Ujihara T, Shuin T, et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage Φ MR11. 2003 Feb 15;187(4):613-24. DOI: 10.1086/374001
45. McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jun; 51(6):1934-8. DOI: 10.1128/AAC.01028-06

References

1. Artyushenko II, Konovalova BC. Ostrye kishechnye zabolevaniya proteinoi etiologii u detei. Kishechnye infektsii. 1987;19:70-73. (In Russian).
2. Gabidulin ZG, Zhukova RA, Bityrshin SL. Enterotoksigenная способность gemolizinproducirovushchikh shtammov proteev, vydelennykh pri ostrykh kishechnykh infektsiyakh u detei. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1990;8:49-53. (In Russian).
3. Guida OG, Chaika NA. Proteinaya kishechnaya infektsiya. Ostrye kishechnye infektsii. 1990:131-132. (In Russian).
4. Khmelevskaya GV, Devterova LV, Shpelev AP, Martinenko AD. Faktory patogennosti nekotorykh uslovno-patogennykh bakterii, vyzyvayushchikh diareyu. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1990;4:97-102. (In Russian).
5. Warren JW, Tenney JH, Hoopes JM, Muncie HL, Anthony WC. A Prospective Microbiologic Study of Bacteriuria in Patients with Chronic Indwelling Urethral Catheters. Journal of Infectious Diseases. 1982; 146(6):719-723.
6. Mobley HLT, Warren JW. Urease-Positive Bacteriuria and Obstruction of Long-Term Urinary Catheters. Journal of Clinical Microbiology. 1987;25(11):2216-2217.
7. Breitenbucher RB. Bacterial changes in the urine samples of patients with long-term indwelling catheters. Archive International Medicine. 1984;144(8):1585-1588.
8. Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nature Clinical Practice. Urology. 2008 Nov;5(11):598-608. DOI: 10.1038/ncpuro1231
9. Griffith DP, Musher DM, Itin C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. Investigative Urology. 1976;13(5):346-350.
10. Jones BD, Mobley HLT. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. Infection Immunity. 1987;55(9):2198-2203.
11. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirliff ME. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Review. 2008;21(1):26-59. DOI: 10.1128/CMR.00019-07
12. Nicolle LE. Catheter-Related Urinary Tract Infection. Drugs Aging. 2005;22(8):627-39. DOI: 10.2165/00002512-200522080-00001
13. Armbruster CE, Prenovost K, Mobley HLT, Mody L. Often Do Clinically Diagnosed Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Nursing Home Residents Meet Standardized Criteria. Journal of the American Geriatrics Society. 2017 Feb;65(2):395-401. DOI: 10.1111/jgs.14533
14. Liassine N, Madec S, Ninet B, Metral C, Fouchereau-Peron M, Labia R, Auckenthaler R. Postneurosurgical Meningitis Due to *Proteus penneri* with

- Selection of a Ceftriaxone-Resistant Isolate: Analysis of Chromosomal Class A - Lactamase *HugA* and its *LysR*-Type Regulatory Protein *HugR*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2002;46(1):216-219. DOI: 10.1128/AAC.46.1.216-219.2002
15. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Review*. 2008 Jan;21(1):26-59. DOI: 10.1128/CMR.00019-07
16. Mobley HLT. Virulence of *Proteus mirabilis*. Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. Washington, ASM Press. 1996. P. 245-265.
17. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Survey of antimicrobial activity of four commonly used third generation cephalosporins tested against recent bacterial isolates from ten American medical centers, and assessment of disk diffusion test performance. *Diagnostic Microbiology Infection Diseases*. 1996;24:213-219.
18. Thornsberry C, Yee C. Comparative activity of eight antimicrobial agents against clinical bacterial isolates from the United States, measured by two methods. *American Journal Medicine*. 1998;(6A):26S-38S.
19. Yao JDC, Moellering RC Jr. Antibacterial agents. (ed. by P.R. Murray). Manual of clinical microbiology (7th edition). Washington: ASM Press, 1999. P.1474-1504.
20. Kehinde A, Adedapo K, Aimakhu, C. Odugbo AT, Olayemi O, Salako B. Urinary pathogens and drug susceptibility patterns of urinary tract infections among antenatal clinic attendees in Ibadan. *Journal Obstetrics Gynecology Research*. 2012;38(1):280-284. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2011.01635.x
21. Nwadioha SI, Nwokedi EE, Jombo GTA, Kashibu E, Alao OO. Antibiotics susceptibility pattern of uropathogenic bacterial isolates from community- and hospital-acquired urinary tract infections in a Nigerian tertiary hospital. *Internet Journal Infectious Diseases*. 2010;8(1). DOI: 10.5580/14f7
22. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -Lactamases Responsible for Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1998;42(6):1350-1354.
23. Chow AW, Taylor PR, Yoshikawa TT, Guze LB. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. *Journal Infectious Diseases*. 1979;139:621-627.
24. Dance DAB, Pearson AD, Seal DV, Lowes JA. A hospital outbreak caused by a chlorhexidine- and antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. *Journal Hospital Infection*. 1987;10(1):10-16.
25. Biedenbach DJ, Jones RN. Predictive accuracy of disk diffusion test for *Proteus vulgaris* and *Providencia* species against five newer orally administered cephalosporins, cefdinir, cefetamet, cefprozil, cefuroxime, and loracarbef. *Journal Clinical Microbiology*. 1994;32(2):559-562.
26. Charles River international Inc. *Proteus mirabilis*. Technical Sheet. <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/ProteusmirabilisTechnicalSheet.pdf>
27. Sosa V, Schlapp G, Zunino P. *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. *Microbiology*. 2006;152(7):2149-2157.
28. Li X, Lockatell CV, Johnson DE, Lane MC, Warren JW, Mobley HLT. Development of an Intranasal Vaccine To Prevent Urinary Tract Infection by *Proteus*. *Infection Immunity*. 2004;72(1):66-75.
29. Johanson DE, Russel RG, Lockatell CV, Zulty JC, Warren JW, Mobley HLT. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending *Proteus mirabilis*. *Infect Immun*. 1993;61(7):2748-2754.
30. Al-Ani IM, Al-Murayati HY, Salman MO, Ghani HM. Histological findings of ascending urinary tract infections in experimental rats caused by *Proteus mirabilis*. *Biomedical Research*. 2011;22(4):425-430.
31. Gekhtman AB. Protektivnye svoistva stafilo-proteino-sinegnoinoi vaksiny na eksperimental'noi modeli vnutrimozgovoi infektsii: Eksperimental'noe issledovanie. Diss. Ufa, 2006, 22 p. (In Russian).
32. Lu Z, Dai T, Huang L, Kurup DB, Tegos GP, Jahnke A, Wharton T, Hamblin MR. Photodynamic therapy with a cationic functionalized fullerene rescues mice from fatal wound infections. *Nanomedicine*. 2010 Dec;5(10):1525-33. DOI: 10.2217/nm.10.98
33. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic Combination of Chitosan Acetate with Nanoparticle Silver as a Topical Antimicrobial: Efficacy against Bacterial Burn Infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2011 Jul;55(7):3432-8. DOI: 10.1128/AAC.01803-10
34. Ikeda Y, Fukuoka Y, Motomura K, Yasuda T, Nishino T. Paradoxical Activity of 1-Lactam Antibiotics against *Proteus vulgaris* in Experimental Infection in Mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1990;34(1):94-97.
35. Moayeri N, Collins CM, O'Hanley P. Efficacy of a *Proteus mirabilis* outer membrane protein vaccine in preventing experimental *Proteus* pyelonephritis in a BALB/c mouse model. *Infection Immunity*. 1991;59(10):3778-3786.
36. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol Res*. 1993;26:371-380. (In Russian).
37. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Abaev IV. Effektivnost' bakteriofaga SA18 pri lechenii eksperimental'noi stafilokokkovoi infektsii u myshei linii BALB/s. *Infektsiya i immunitet* (Russian Journal of Infection and Immunity). 2017;S:906. (In Russian).
38. Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_KpnP_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. *Bacteriology*. 2017;2(1):73-77. (In Russian).
39. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. *Bacteriology*. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
40. Melo LDR, Veiga P, Cerca N, Kropinski AM, Almeida C, Azeredo J, and Sanna Sillankorva. Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-associated Urinary Tract Infections. *Front Microbiol*. 2016 Jun 28;7:1024. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01024
41. Carson L, Gorman SP, Gilmore BF. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Aug;59(3):447-55. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00696.x
42. Kumari S, Kusum H, Sanjay C. Efficacy of Bacteriophage Treatment in Murine Burn Wound Infection Induced by *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Biotechnol*. 2009 Jun;19(6):622-8. DOI: 10.4014/jmb.0808.493
43. Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. *J Med Microbiol*. 2011 Feb;60(Pt 2):205-210. DOI: 10.1099/jmm.0.018580-0
44. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda, Ujihara T, Shuin T, et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage Φ MR11. 2003 Feb 15;187(4):613-24. DOI: 10.1086/374001
45. McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun;51(6):1934-8. DOI: 10.1128/AAC.01028-06

Информация об авторах:

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, д. 24, территория «Квартал А», п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: korobova@obolensk.org

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, д. 24, территория «Квартал А», п. Оболensk, г. Серпухов, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Мякина Вера Павловна, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: myakinina@obolensk.org

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. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: krasilnikova@obolensk.org

Верёвкин Владимир Васильевич, 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. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: verevkin@obolensk.org

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нано-биотехнологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: info@obolensk.org

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. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: nikvol@obolensk.org

Information about authors:

Olga V. Korobova, PhD (Biology), senior researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
Address: 24 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: korobova@obolensk.org

Tatiana I. Kombarova, PhD (Biology), senior researcher of biological testing laboratory of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
Address: 24 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Vera P. Myakinina, researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: myakinina@obolensk.org

Valentina M. Krasilnikova, PhD (Biology), senior researcher of laboratory molecular diagnostics and genetic engineering preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: krasilnikova@obolensk.org

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biology), senior researcher of laboratory molecular diagnostics and genetic engineering preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: verevkin@obolensk.org

Elena A. Ganina, researcher of nanobiotechnology laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: info@obolensk.org

Nikolay V. Volozhantsev, PhD (Biology), leading researcher of laboratory molecular diagnostics and genetic engineering preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: nikvol@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Обнаружен механизм защиты от антибиотиков у опасных бактерий

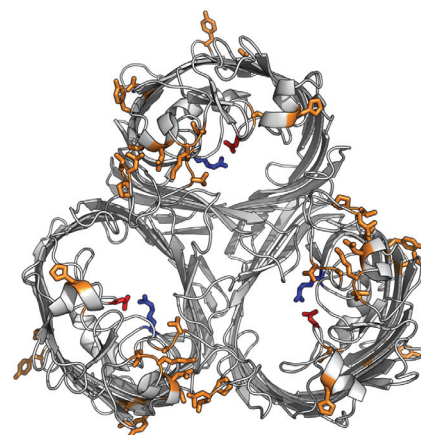
Группа ученых из Имперского колледжа Лондона (Великобритания) исследовала бактерии *Klebsiella pneumoniae*. Эта бактерия является опасной внутрибольничной инфекцией, проникающей в легкие и кровь пациентов с ослабленным иммунитетом.

Как и многие другие опасные бактерии, палочка Фридлендера становится все более невосприимчивой к самым эффективным антибиотикам.

Исследователи сравнили структуры устойчивых и восприимчивых к карбапенемам бактерий *Klebsiella pneumoniae*. В структуре клеток бактерии существуют поверхностные поры, через которые антибиотики попадают внутрь возбудителя. В устойчивых к антибиотикам клетках исследователи обнаруживали измененные версии белка, формирующего поры в клеточной стенке, или вовсе не находили такого белка.

В опытах на мышах выяснилось, что «закупорившиеся» бактерии потребляют меньше питательных веществ, что приводит к замедлению их роста и ослаблению, но не влияет на их резистентность к антибиотикам. Эти изыскания могут способствовать в разработке препаратов, способных «вскрывать замки» бактерий.

По оценкам ВОЗ, около 70 тыс. человек ежегодно умирают от устойчивых к лекарствам штаммов бактериальных инфекций, СПИДа, туберкулеза и малярии. Эксперты предупреждают, что к 2050 году эта цифра может увеличиться до 10 млн.



Использование комплекса питательных сред для выявления заквасочных культур в кисломолочных продуктах

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

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

Изучена возможность использования комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ для выявления, первичной идентификации и подсчета жизнеспособных молочнокислых бактерий и бифидобактерий в коммерческих образцах кисломолочных продуктов.

Ключевые слова: молочнокислые микроорганизмы, лактобактерии, термофильный стрептококк, лактококки, бифидобактерии, питательные среды, MRS agar, agar M17, среда ОББ, среда Бликфельда

Для цитирования: Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Косилова И.С., Детушев К.В., Шепелин А.П. Использование комплекса питательных сред для выявления заквасочных культур в кисломолочных продуктах. Бактериология. 2020; 5(1): 25–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-25-32

Using of the nutrient complex for the identification of filling crops in dairy products

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

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

The possibility of using the nutrient media complex produced by SCRAMB for the isolation, primary identification and counting of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in the fermented milk products was studied.

Key words: Lactic acid bacteria, Lactobacillus, Streptococcus thermophilus, Lactococcus, Bifidobacterium, MRS agar, M 17 agar, OBB medium, Blikfeldt's medium

For citation: Morozova T.P., Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Kosilova I.S., Detushev K.V., Shepelin A.P. Using of the nutrient complex for the identification of filling crops in dairy products. Bacteriology. 2020; 5(1): 25–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-25-32

Качество продуктов питания является важнейшим фактором формирования здорового образа жизни и здоровья российских граждан. Принятая постановлением Правительства РФ в 2016 г. «Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года» представляет собой основу для формирования национальной системы управления качеством пищевой продукции. В соответствии со «Стратегией» производимые и обрабатываемые на рынке пищевые продукты должны быть, с одной стороны, безопасными по микробиологическим показателям и, с другой, надлежащего качества [1]. Микробиологические показатели качества установлены техническими регламентами таможенного союза [2, 3].

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, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 30.01.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

Для кисломолочных продуктов понятие микробиологического качества связано с отсутствием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и наличием жизнеспособных заквасочных молочнокислых микроорганизмов. Состав заквасок может быть представлен одним или несколькими микроорганизмами, обеспечивающими свойства кисломолочного продукта. К наиболее важным бактериальным заквасочным культурам относятся молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии и бифидобактерии.

В соответствии с техническими регламентами содержание молочнокислых микроорганизмов определяется классическим культуральным методом с использованием питательных сред. Получение достоверных и воспроизводимых

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 30.01.2020, accepted for publication 27.03.2020

результатов большинства испытаний зависит от качества питательных сред. В лабораториях, занятых микробиологическими исследованиями пищевых продуктов, объектов окружающей среды, основными целями являются обнаружение, выделение, подсчет, поддержание и выращивание самых разнообразных микроорганизмов. Поэтому стандартные питательные среды, удовлетворяющие установленным критериям эффективности, являются необходимым условием надежных результатов любого микробиологического исследования.

Спектр питательных сред, применяемых для определения и подсчета технологически значимой микрофлоры в молочнокислых продуктах, обозначен в действующих нормативных документах. Для выявления и подсчета *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ГОСТ ISO 27205-2013 предписывает использование MRS агара, для *Lactobacillus acidophilus* – селективный вариант MRS агара с клиндамицином и ципрофлоксацином, для лактококков и *Streptococcus thermophilus* – агара M17, а для бифидобактерий – TOS с мупироцином [4]. Для выявления и подсчета молочнокислых микроорганизмов ГОСТ 33951-2016 определяет использование питательных сред лабораторного приготовления на основе гидролизованного молока и различных пептонов [5]. Требованиями ГОСТ Р 56139-2014 для подсчета молочнокислых бактерий регламентируется применение MRS агара, стерилизованного обезжиренного молока, а для бифидобактерий – модифицированной печеночно-цистеиновой среды Блаурокка, бифидум-среды, TOS-пропионатного агара с мупироцином лития [6]. Питательная среда TOS-MUP также рекомендована для подсчета презумптивных бифидобактерий требованиями ГОСТ ISO 29981-2013 [7]. Для подсчета бифидобактерий ГОСТ 33924-2016 устанавливает метод селективного подсчета бифидобактерий с использованием питательной среды ОББ с диклоксациллином или неомицином.

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработаны и выпускаются промышленные сухие питательные среды для культивирования и подсчета молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий:

1) MRS агар – питательная среда для выделения, подсчета и культивирования лактобацилл сухая (сертификат соответствия РОСС RU АГ 58. НОО 489) предназначена для культивирования, выделения и подсчета всех видов *Lactobacillus* из пищевых продуктов и других тестируемых материалов. Выпускается в двух модификациях: модификация 1 – плотная среда; модификация 2 – полужидкая среда;

2) агар M17 – питательная среда для определения и подсчета молочнокислых стрептококков сухая (сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО 636) предназначена для определения и подсчета молочнокислых стрептококков в йогурте и в других молочнокислых продуктах, содержащих *Streptococcus thermophilus*;

3) среда ОББ – питательная среда для определения и подсчета бифидобактерий сухая (сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО 634) предназначена для определения и подсчета бифидобактерий. Выпускается в двух модификациях: модификация 1 – плотная среда; модификация 2 – полужидкая среда;

4) среда Бликфельдта – питательная среда для выявления молочнокислых бактерий сухая (сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО 635) предназначена для выявления общего количества молочнокислых микроорганизмов в исследуемом образце. Выпускается в двух модификациях: модификация 1 – бульон; модификация 2 – полужидкая среда.

Целью данной работы являлось изучение возможности использования комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) для выявления и подсчета жизнеспособных молочнокислых бактерий и бифидобактерий в коммерческих образцах кисломолочных продуктов.

Материалы и методы

В работе использовали следующие *питательные среды*: MRS агар (модификация 1), серия 3, годен до 07.2021; MRS агар полужидкий (модификация 2) серия 3, годен до 07.2021; агар M17 серия 1, годен до 06.2021; среда ОББ (модификация 1) серия 2, годен до 06.2021; среда ОББ полужидкая (модификация 2) серия 2, годен до 06.2021; среда Бликфельдта полужидкая (модификация 2) серия 1, годен до 06.2021.

Среды готовили в соответствии с инструкциями по приготовлению для каждой используемой среды.

Дополнительно готовили MRS агар (модификации 1 и 2) с селективной добавкой (5,0 мг/л диклоксациллина, 3,0 г/л хлористого лития и 0,3 г/л цистеина гидрохлорида) и среду ОББ (модификация 1) с селективной добавкой (10 мг/л неомицина).

В работе использовали диклоксациллина натриевую соль моногидрат (Dicloxacillin sodium salt monohydrate, Sigma, кат. № D 9016), неомицина трисульфат гидрат (Neomycin trisulfate salt hydrate, Sigma, кат. № N 1876).

Стерильные полужидкие среды в пробирках (среда ОББ модификации 2 и MRS агар модификации 2) перед работой регенерировали путем прогрева в кипящей водяной бане в течение 10 мин.

Анаэробные условия для инкубирования чашек Петри с бактериологическими посевами создавали в анаэростатах АЭ-01 с использованием газогенерирующих пакетов (BD GasPak EZ Anaerobe Pouch System with Indicator Sachets, Becton Dickinson, кат. № 260683).

Образцы исследуемых коммерческих молочнокислых продуктов

Все образцы исследовали в пределах срока годности. На этикетках для некоторых образцов приведен состав молочнокислых заквасок и пробиотиков, для других же отмечено использование йогуртовой закваски без обозначения спектра используемых заквасочных культур. Характеристика исследуемых образцов представлена в таблице 1.

Пробоподготовка образцов

Подготовку образцов к анализу проводили согласно ГОСТ ISO 68871-2017 [9]. Перед исследованием упаковку образца протирали 70%-м этанолом, содержимое тщатель-

Таблица 1. Характеристика образцов исследуемых молочнокислых продуктов

№ образца	Продукт, ГОСТ или ТУ	Производитель	Состав заквасочных и пробиотических микроорганизмов	Концентрация микроорганизмов в продукте, заявленная производителем, КОЕ/г
1.	«Варенец Останкинский термостатный», ГОСТ 31667-2012	ООО Останкинский молочный комбинат, Москва	Термофильный стрептококк	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$
2.	«Bio Баланс. Биойогурт, обогащенный бифидобактериями», ТУ 10.51.52-042-13605199	Молочный комбинат Владимирский, филиал АО «Данон Россия»	Йогуртовые культуры и пробиотические культуры (бифидобактерии)	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$; бифидобактерии не менее $1,0 \times 10^6$
3.	«Биолакт Тема кисломолочный», ТУ 10.86.10-036-13605199	АО «Данон Россия», филиал, Санкт-Петербург	Термофильный стрептококк и ацидофильная палочка	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$; лактобактерии – не менее $1,0 \times 10^7$
4.	«Гадкий Я. Йогурт. Персик-маракуйя двухслойный», ТУ 9222-001-00419185-14	ООО «Пробиотик плюс», Московская область	Термофильный стрептококк и болгарская палочка	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$
5.	«Биойогурт Активиа термостатный», ТУ 10.51.52-008-48779702	АО «Данон Россия», Московская область	Йогуртовая закваска, бифидобактерии ActiRegularis	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$; бифидобактерии – не менее $3,4 \times 10^7$
6.	«Actimel. Кисломолочный напиток. Гранат», ТУ 10.51.52-013-45779702	АО «Данон Россия», Московская область	Йогуртовая закваска, обогащенная <i>Lactobacillus casei imunitass</i>	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$; лактобактерии – не менее $1,0 \times 10^7$
7.	«Напиток Имунеле кисломолочный фруктовый ароматизированный», ТУ 10.86.10-142-05268977-2014	АО «Вимм-Билль-Данн», Москва	Закваска и пробиотические культуры (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>)	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^6$; пробиотические культуры – не менее $1,0 \times 10^6$

Обозначение: м/о – микроорганизмы.

но перемешивали, в асептических условиях отбирали 10 ± 1 г исследуемого образца в стерильную колбу объемом 200 см³, добавляли забуференную пептонную воду (ГНЦ ПМБ, Оболенск, сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО490) до получения общей навески 100 ± 1 г и тщательно перемешивали на встряхивателе «Vortex». После этого готовили ряд десятикратных разведений в 0,9%-м растворе хлорида натрия до разведения 10^{-8} (включая исходное разведение при пробоподготовке) и производили посев трех последних разведений на питательные среды.

Посев и учет результатов

Все исследуемые образцы высевали на следующие среды: MRS агар модификаций 1 и 2, агар M17, среду Бликфельда модификации 2, а образцы 2 и 5, обогащенные бифидобактериями, дополнительно высевали на среду ОББ (модификации 1 и 2) с селективной добавкой и без нее, а также на MRS агар (модификации 1 и 2) с селективной добавкой. Посев и учет результатов производили в соответствии с ГОСТ 33951-2016, ГОСТ ISO 7889-2015 [6, 10].

По 1,0 мл из разведений 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} каждого исследуемого образца вносили в стерильные чашки Петри или в пробирки, а затем добавляли стерильную плотную питательную среду (MRS агар модификации 1, агар M17 или ОББ модификации 1), охлажденную до температуры $45 \pm 1^\circ\text{C}$, по 15 мл в чашку Петри или по 9 мл в пробирку, аккуратно перемешивали и оставляли до полного застывания. Посевы в чашках Петри в MRS агаре и среде ОББ инкубировали в анаэробных условиях, а посевы в агаре M17 – в аэробных условиях при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 48–72 ч. В аэробных и аналогичных временных и температурных условиях инкубировали посевы в пробирках. Посевы образцов (кроме образца 1) в агаре M17 дополнительно инкубировали при температурах $45 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 48 ч и комнатной температуре ($20\text{--}25^\circ\text{C}$) в течение 5 дней для дифференциации термофильного стрептококка и лактококков.

В полужидкие среды (MRS агар модификации 2, среда ОББ модификации 2, среда Бликфельда модификации 2), разлитые в пробирки, вносили по 1 мл каждого разведения

исследуемого образца в толщу столбика, аккуратно перемешивали и инкубировали посевы в аэробных условиях при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч.

Учет результатов производили визуально, учитывая характер роста и количество выросших колоний.

Расчет концентрации микроорганизмов, присутствовавших в исходной пробе, проводили по следующей формуле:

$$N = \frac{\sum C}{V \times d \times (n_1 + 0,1n_2)},$$

где N – концентрация микроорганизмов в исходной пробе; $\sum C$ – общее подсчитанное количество выросших колоний во всех чашках Петри или пробирках; V – объем посевного материала, внесенного в чашку Петри или пробирку, мл; n_1 – количество чашек Петри или пробирок, на которых производили подсчет колоний в меньшем разведении; n_2 – количество чашек Петри или пробирок, на которых производили подсчет колоний в большем разведении; d – степень разведения, из которого осуществляли бактериологический посев.

Идентификация микроорганизмов

Идентификацию, т.е. подтверждение выявления на питательных средах лактобацилл, или термофильного стрептококка, или бифидобактерий, или молочнокислых микроорганизмов, проводили по характеру роста на соответствующих питательных средах и методом световой микроскопии с окраской по Граму.

Окончательную идентификацию осуществляли методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием масс-спектрометрической системы идентификации MALDI Biotyper 3.0 Microflex (Bruker).

В процессе проведения идентификации учитывали значение индекса совпадения (Score Value): показатель свыше 2,300 свидетельствовал о достоверной видовой идентификации; от 2,000 до 2,299 – о достоверной идентификации до рода и вероятной идентификации до вида; от 1,700 до 1,999 – о вероятной идентификации до рода; от 0,000 до 1,699 – о получении недостоверного результата.

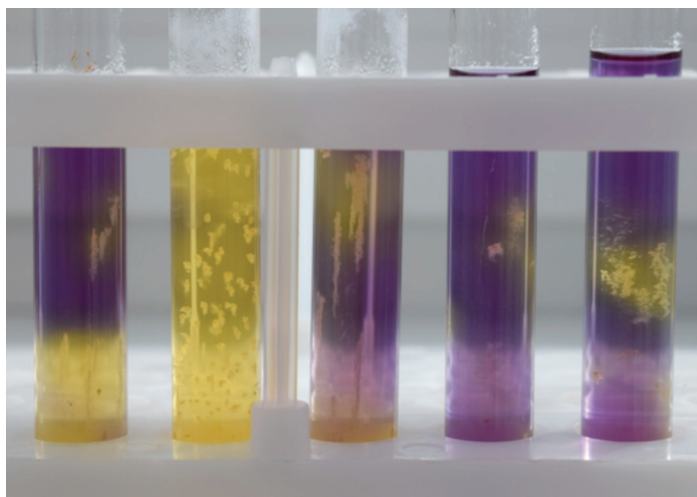


Рис. 1. Колонии с различной морфологией, выросшие из образцов 4 и 6 на среде Бликфельда модификации 2 через 24 ч инкубирования.

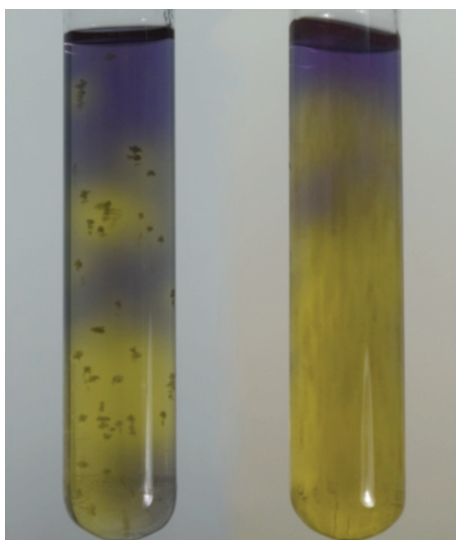


Рис. 2. Рост тест-штаммов на среде Бликфельда модификации 2 через 18 ч инкубирования: слева – *S. thermophilus* ATCC 19258; справа – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842.

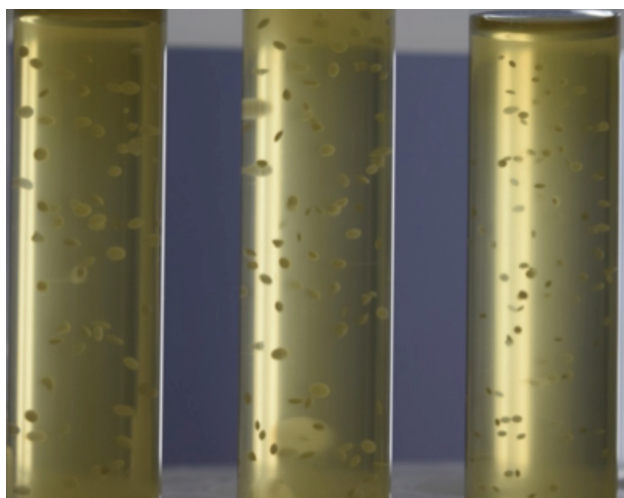


Рис. 3. Колонии термофильного стрептококка, выросшие из образца 7 в пробирках с агаром М17 через 24 ч инкубирования, разведение 10^{-7} .

Для проведения идентификации методом MALDI TOF MS выделенные культуры пересеивали поверхностным способом на питательную среду № 1 ГРМ с добавлением 4,0 г/л глюкозы и 5,0 г/л лактозы и на MRS агар (модификация 1). Посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования проанализировано 7 образцов молочнокислых продуктов, два из которых (образцы 2 и 5) обогащены бифидобактериями и два (образцы 6 и 7) – пробиотическими культурами *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus casei*. При посеве исследуемых образцов на питательные среды получены следующие результаты.

На среде Бликфельда в модификации 2 рост микроорганизмов наблюдали через 24 ч во всех образцах в виде «тяжей», «шариков» и «звездочек» различных размеров и степени четкости с изменением цвета среды вокруг колоний с пурпурного на желтый при росте единичных колоний из разведения 10^{-8} и с изменением цвета всего столбика среды и наличием прозоны в его верхней части из разведения 10^{-6} (рис. 1). По наличию колоний разных типов в одном образце можно предположить использование не менее двух видов заквасочных культур. При посеве на данную питательную среду тест-штаммов отмечали рост *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 в виде компактных «шариков» и «звездочек», в то время как штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 рос в виде «тяжей» (рис. 2).

На агаре М17 посевы образцов (кроме образца 1) инкубировали при двух температурах – $45 \pm 1^\circ\text{C}$ и комнатной ($20\text{--}25^\circ\text{C}$) – с целью дифференциации термофильного стрептококка от лактококков, которые могут входить в состав заквасок. Требованиями ГОСТ ISO 27205-2013 для выявления лактококков из многовидовой закваски определена температура $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Посевы образца 1 инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Колонии микроорганизмов, выросших на среде при температуре инкубации $45 \pm 1^\circ\text{C}$, имели вид «дисков» (рис. 3). При комнатной температуре колонии были значительно мельче и напоминали «манную крупу». В мазках, приготовленных из колоний, выросших при температуре $45 \pm 1^\circ\text{C}$, обнаруживаются крупные единичные и соединенные в цепочки кокки (рис. 4а), а при комнатной температуре – более мелкие кокки (рис. 4б).

На MRS агаре в модификации 1 через 48–72 ч инкубации наблюдали рост культур изо всех образцов в толще агара в виде «чечевицы», а на поверхности – в виде мелких белых полупрозрачных колоний. На полужидком MRS агаре (модификация 2) рост обнаружен через 24–28 ч инкубации в виде «комет» и «тяжей» (рис. 5). При микроскопии мазков из выросших колоний наблюдали грамположительные неспорообразующие палочки – от длинных и тонких до коротких, типичных для лактобацилл (рис. 6).

При посеве образца № 1 на MRS агаре в обеих модификациях вырастали очень мелкие колонии, образованные кокками.

С использованием селективного варианта полужидкого MRS агара через 24 ч инкубации в образцах 2 и 5 наблюдали рост культур в виде «комет» и «тяжей». На селективном

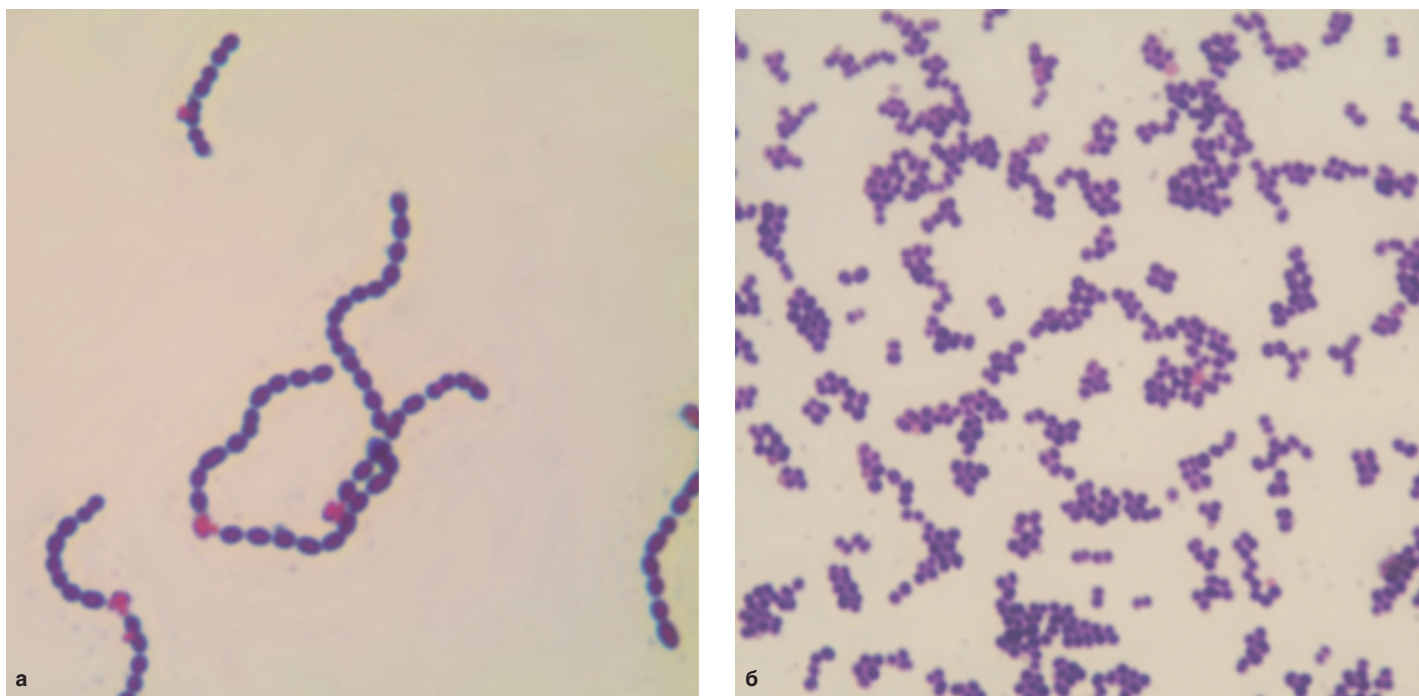


Рис. 4. Микрофотография окрашенных по Граму клеток бактерий, выросших из образца 5 на Агаре М17: а – при температуре $45 \pm 1^\circ\text{C}$; б – при комнатной температуре. Увеличение $\times 1000$.

варианте MRS агара в модификации 1 через 48–72 ч инкубации в анаэробных условиях выросло небольшое количество колоний, предположительно относящихся к роду *Bifidobacterium*.

На среде ОББ в модификации 1 при анализе образцов 2 и 5, в которых производителем заявлено содержание бифидобактерий, через 48–72 ч инкубации посевов рост культур наблюдали в виде «дисков» и «шариков» в толще агара, а на среде ОББ в модификации 2 через 24–48 ч – в виде «тяжей», «комет» и очень мелких колоний в виде «манной крупы» с наличием прозоны в верхней части столбика среды. Аналогичный характер роста отмечен на селективном варианте среды ОББ с неомицином (рис. 7).

В мазках всех культур, выделенных на селективных средах из образцов 2 и 5, присутствовали типичные клетки бифидобактерий в виде грамположительных, неподвижных, неспорообразующих палочек с выраженным полиморфизмом: прямые, изогнутые или разветвленные палочки, раздвоенные Y- или V-образной формы, булавовидные, расположенные одиночно, цепочками или скоплениями в виде «китайских иероглифов».

Выросшие колонии из всех образцов на разных средах были подсчитаны, используя разведение, из которого росло 15–200 колоний на чашке, и рассчитывали суммарное количество характерных микроорганизмов в исследуемом образце. Результаты представлены в табл. 2. Анализ полученных данных по количественному содержанию молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий в исследуемых образцах показал полное их соответствие заявленным производителями показателям.

На основе характера роста на питательных средах и результатов микроскопического исследования проведена предварительная идентификация выросших культур до рода (табл. 3). Из всех образцов выделен и идентифицирован

Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus*. Вторая обязательная для йогуртовой закваски культура – болгарская палочка – выделена и идентифицирована только как *Lactobacillus* spp. В образцах 5 и 6 идентифицированы лактококки, а в образцах 2 и 5 – бифидобактерии.

Для уточнения видовой принадлежности выделенные культуры после субкультивирования дополнительно идентифицированы методом MALDI-TOF MS. Идентификацию бифидобактерий масс-спектрометрией не осуществляли, поскольку не производили пересев на плотные питательные среды для бифидобактерий поверхностным способом. Полученные данные представлены в таблице 3.

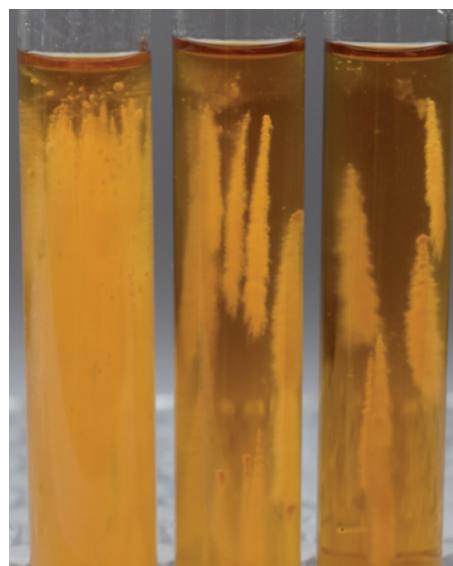


Рис. 5. Колонии лактобактерий, выросшие из образца 6 на MRS агаре модификации 2 через 48 ч инкубирования. Слева направо: разведения 10^{-6} – 10^{-8} .

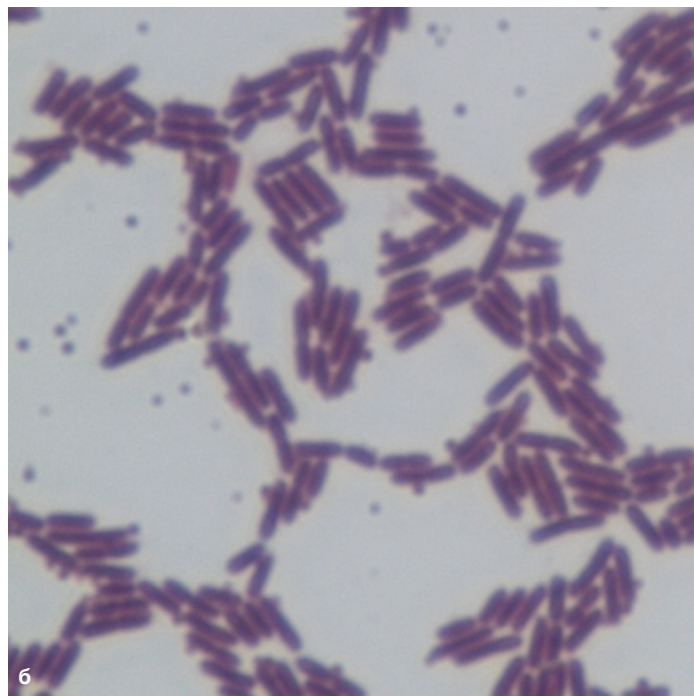
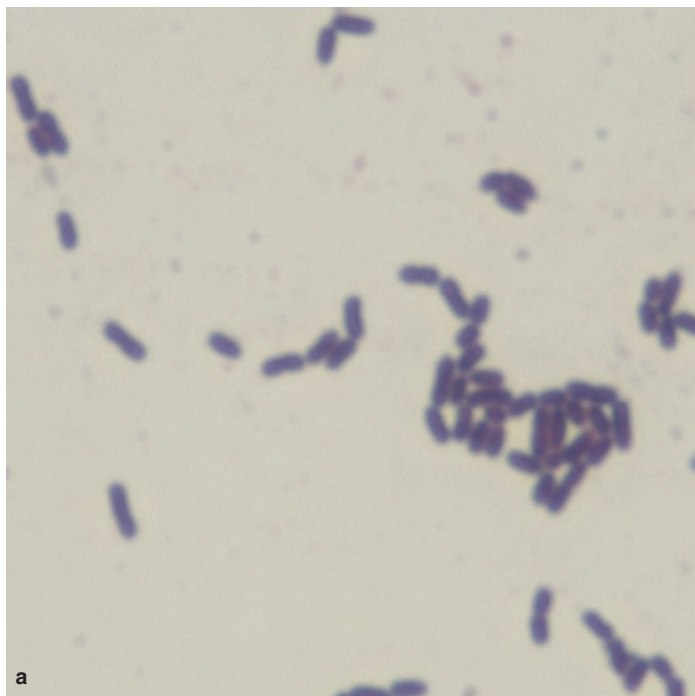


Рис. 6. Микрофотография окрашенных по Граму клеток лактобактерий, выросших на MRS агаре модификации 2: а – из образца 6; б – из образца 7. Увеличение $\times 1000$.

Анализируя результаты, полученные методом MALDI TOF MS, можно отметить, что из 7 исследуемых образцов удалось идентифицировать 6 различных культур. Полное совпадение состава заявленных заквасочных культур с выделенными и идентифицированными отмечалось в образцах 1 и 3, содержащих в своем составе *S. salivarius* ssp. *thermophilus* (образец 1), *L. acidophilus* и *S. salivarius* ssp. *thermophilus* (образец 3).

В ходе исследований образца 2 выделены и идентифицированы молочнокислые бактерии *L. rhamnosus* и *S. salivarius* ssp. *thermophilus*, которые, как правило, входят в йогуртовую закваску.

В образце 4 выделенные культуры идентифицированы как *S. salivarius* ssp. *thermophilus* и *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, заявлены термофильный стрептококк и болгарская палочка.

Из образца 5, содержащего йогуртовую закваску и обогащенный бифидобактериями *ActiRegularis*, выделены и идентифицированы *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis*, *S. salivarius* ssp. *thermophilus*.

Культуры, выделенные из образца 6, идентифицированы как *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Lactococcus lactis* и *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, а из образца 7 – как *L. rhamnosus*, *L. casei* и *S. salivarius* ssp. *thermophilus*.

Учитывая, что для всех идентифицированных культур лактобактерий и лактококков в образцах с 4 по 7, за исключением *L. rhamnosus* в образце 7, индекс совпадения был ниже 2,300, полученные результаты по их видовой принадлежности могут быть неточными.

Несоответствие между бактериальными видами и даже иногда родами, заявленными на этикетке кисломолочных продуктов и идентифицированными MALDI TOF MS, отмечено в некоторых публикациях [11, 12]. Возможно, расширение справочных баз данных позволит проводить более точную идентификацию видов *Lactobacillus*, или для достижения более надежной идентификации необходимо использовать сочетание MALDI TOF масс-спектрометрии с генотипическими методами [13].

Анализ полученных данных показал, что для выявления и подсчета заквасочных культур необходимо использовать следующие питательные среды:

– общее количество молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий следует исследовать на среде Бликфельда модификации 2, где наблюдается характерный рост культур с изменением цвета среды с пурпурного на желтый;

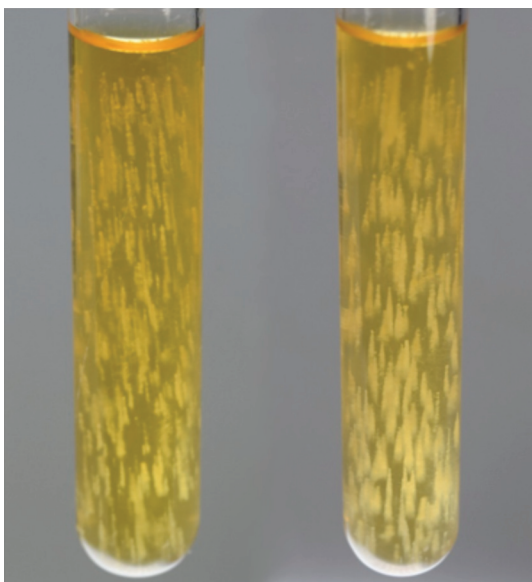


Рис. 7. Рост колоний бифидобактерий из образца 5 на среде ОББ модификации 2 с неомицином через 24 ч инкубирования, разведение 10^{-6} .

Таблица 2. Концентрация микроорганизмов в исследуемых образцах, выявленных на разных питательных средах (КОЕ/г)

№ образца	Среда Бликфельдта мод. 2	MRS агар		Агар M17		MRS агар с СД		Среда ОББ		
		мод. 1	мод. 2	при 45 ± 1°C (37°C – для образца 1)	при комнатной температуре	мод. 1	мод. 2	мод. 1	мод. 1 с СД	мод. 2
1	2,5 × 10 ⁸	1,6 × 10 ⁶ очень мелкие колонии	1,9 × 10 ⁶ очень мелкие колонии	1,87 × 10 ⁸	—*	—	—	н/в**	н/в	н/в
2	3,0 × 10 ⁸	2,0 × 10 ⁸	1,8 × 10 ⁸	2,2 × 10 ⁸	—	4,2 × 10 ⁴	1,3 × 10 ⁵	3,0 × 10 ⁸	1,9 × 10 ⁷	2,8 × 10 ⁸
3	1,0 × 10 ⁷	1,0 × 10 ⁷	4,0 × 10 ⁷	6,0 × 10 ⁷	—	—	—	н/в	н/в	н/в
4	1,0 × 10 ⁸	1,0 × 10 ⁸	8,0 × 10 ⁷	1,8 × 10 ⁷	—	—	—	н/в	н/в	н/в
5	1,9 × 10 ⁸	1,5 × 10 ⁸	1,2 × 10 ⁸	8,5 × 10 ⁷	1,0 × 10 ⁶	1,4 × 10 ⁶	2,2 × 10 ⁶	2,0 × 10 ⁸	2,6 × 10 ⁷	2,8 × 10 ⁸
6	1,0 × 10 ⁸	7,0 × 10 ⁷	7,0 × 10 ⁸	1,1 × 10 ⁸	9,0 × 10 ⁶	—	—	н/в	н/в	н/в
7	1,65 × 10 ⁸	1,6 × 10 ⁷	1,0 × 10 ⁷	2,1 × 10 ⁷	—	—	—	н/в	н/в	н/в

Обозначение: * «—» – рост отсутствует; ** «н/в» – не высевали.

Таблица 3. Идентификация культур, выделенных из исследованных образцов

№ образца	Состав заквасок, заявленный производителем	Идентификация по характеру роста и микроскопии	Идентификация MALDI-TOF MS	Индекс совпадения
1	Закваска термофильного стрептококка	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ;	2,028 2,425
2	Йогуртовая закваска, бифидобактерии	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,085
3	Термофильный стрептококк и ацидофильная палочка	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,452 2,035
4	Термофильный стрептококк и болгарская палочка	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,031 1,852
5	Йогуртовая закваска, бифидобактерии ActiRegularis	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactococcus Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ; <i>Lactococcus lactis</i>	2,277 1,956 2,269
6	Йогуртовая закваска, обогащенная <i>Lactobacillus casei</i> imunitass	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactococcus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,298 2,029 2,224 1,852
7	Закваска и пробиотические культуры (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>)	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,436 2,029 2,035

– для термофильного стрептококка необходимо использовать агар M17, на котором в аэробных условиях при температуре 45°C рост молочнокислых бактерий и бифидобактерий подавляется;

– для лактококков необходимо образцы кисломолочных продуктов высевать на агар M17 и инкубировать посевы при температуре 30 °C;

– для лактобактерий предпочтительнее использовать MRS агар, где термофильный стрептококк при анаэробных условиях не растет или растет в виде очень мелких колоний;

– для бифидобактерий рекомендовано использование среды ОББ, в смешанных культурах – селективного варианта среды ОББ с неомицином или селективного варианта MRS агара с цистеином гидрохлоридом, хлористым литием и диклосакциллином, при использовании которых рост лактобактерий и термофильного стрептококка подавляется.

Выводы

Проведенное исследование показало, что использование комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk) для выделения и подсчета молочнокислых бактерий и бифидобактерий при микробиологическом анализе кисломолочных продуктов позволяет выявлять спектр технологически значимой заквасочной микрофлоры, такой как

термофильный стрептококк, лактобактерии и лактококки, а также бифидобактерии.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29 июня 2016 г. № 1364-р.
2. О безопасности пищевой продукции: Технический регламент Таможенного союза. ТР ТС 021/2011.
3. О безопасности молока и молочной продукции: Технический регламент Таможенного союза. ТР ТС 033/2013.
4. Продукты кисломолочные. Бактериальные заквасочные культуры: ГОСТ ISO 27205-2013.
5. Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов: ГОСТ 33951–2016.

6. Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов: ГОСТ Р 56139-2014.
7. Продукты молочные. Подсчет presumptивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37°C: ГОСТ ISO 29981-2013.
8. Молоко и молочная продукция. Методы определения бифидобактерий: ГОСТ 33924-2016. Введен 01.09.2017. М.: Стандартинформ; 2016.
9. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений: ГОСТ ISO 6887-1-2015.
10. Йогурт. Подсчет характерных микроорганизмов. Методика подсчета колоний микроорганизмов после инкубации при температуре 37°C: ГОСТ ISO 7889-2015.
11. Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*. 2011 Oct;76(8):M568-72. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x
12. Duskova M, Sedo O, Ksicova K, et al. Identification of Lactobacilli Isolated From Food by Genotypic Methods and MALDI-TOF MS. *Int J Food Microbiol*. 2012 Oct 1;159(2):107-14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029
13. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, et al. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol*. 2014 Dec 14;14:312. DOI: 10.1186/s12866-014-0312-5

References

1. Strategy on improvement of the quality of food products in the Russian Federation until 2030, adopted by the Governmental Order of 29 June 2016 No. 1364-p.
2. Technical regulations of Customs Union. On food safety. TR TS 021/2011 (TR CU 021/2011).
3. Technical regulations of Customs Union. On the safety of milk and dairy products. TR TS 033/2013 (TR CU 033/2013).
4. Fermented milk products. Bacterial starter cultures. Standard of identity. GOST ISO 33951-2016.
5. Milk and milk products. Methods for determination of the lactic acid bacteria. GOST 33951-2016.
6. Functional foods and foods for special dietary uses. Methods for detection and enumeration of probiotic microorganisms. GOST R 56139-2014.
7. Milk products. Enumeration of presumptive bifidobacteria. Colony count technique at 37°C. GOST ISO 29981-2013.
8. Milk and milk products. Methods for determination of the bifidobacterium. GOST 33924-2016.
9. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. GOST ISO 6887-1-2015.
10. Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms. Colony-count technique after incubation at 37°C. GOST ISO 7889-2015.
11. Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*. 2011 Oct;76(8):M568-72. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x
12. Duskova M, Sedo O, Ksicova K, et al. Identification of Lactobacilli Isolated From Food by Genotypic Methods and MALDI-TOF MS. *Int J Food Microbiol*. 2012 Oct 1;159(2):107-14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029

13. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, et al. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol*. 2014 Dec 14;14:312. DOI: 10.1186/s12866-014-0312-5

Информация об авторах:

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: morozova@obolensk.org

Подкопаев Ярослав Васильевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: podkopaev@obolensk.org

Косилова Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: kosilova.irina@gmail.com

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

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-002
E-mail: shepelin@obolensk.org

Information about authors:

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

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

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

Konstantin V. Detushev, junior researcher, collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1919
E-mail: detushevkv@obolensk.org

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

Выделение эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови

И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, О.И.Седых, В.А.Батурин, А.Д.Болатчиев, А.А.Ефременко

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»,
Ставрополь, Российская Федерация

Одним из главных направлений в решении проблемы антибиотикорезистентности микроорганизмов является создание новых антимикробных средств. Для преодоления лекарственной устойчивости перспективным решением может быть использование антимикробных пептидов (АМП). Целью данной работы являлась разработка технологии выделения эндогенных антимикробных пептидов. Использование в качестве исходного сырья лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров и разделительной колонки с Сефадексом G-25 позволило оптимизировать метод выделения фракций с наибольшим содержанием эндогенных АМП. Способ обеспечивал получение 200 мл фракции, содержащей дефензин-альфа 1 в концентрации 0,335 мкг/мл. Данная технология сокращает производственный цикл, обеспечивает низкую себестоимость фармацевтических композиций с содержанием выделенных эндогенных АМП.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, дефензины, ниосомы, антибиотикостойчивые микроорганизмы

Для цитирования: Базиков И.А., Мальцев А.Н., Седых О.И., Батурин В.А., Болатчиев А.Д., Ефременко А.А. Выделение эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови. Бактериология. 2020; 5(1): 33–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-33-36

Isolation of endogenous antimicrobial peptides from blood cells

I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, O.I.Sedykh, V.A.Baturin, A.D.Bolatchiev, A.A.Efremenko

Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

A technique for isolating the endogenous antimicrobial peptides (AMP) has been developed. Leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass of donors was used as the material for preparing endogenous AMP. The hydrolysate was obtained with the trypsin solution from this mass, and then the components were fractionated using the filter chromatography column (Simax CSN ISO 3585, Russia). For gel filtration, 1.5 g of Sephadex G-25 was applied to the filter surface followed by sterilizing filtration of the obtained substance through bactericidal filters having a pore diameter of 0.2 μ m. The antimicrobial peptide fractions were isolated using high performance liquid chromatography. Subsequently, AMP were encapsulated into the organosilicon niosomes.

Key words: antimicrobial peptides, defensins, niosomes, antibiotic-resistant microorganisms

For citation: Bazikov I.A., Maltsev A.N., Sedykh O.I., Baturin V.A., Bolatchiev A.D., Efremenko A.A. Isolation of endogenous antimicrobial peptides from blood cells. Bacteriology. 2020; 5(1): 33–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-33-36

В настоящее время в науке и медицине большое внимание уделяется веществам, воздействующим на антибиотикостойчивую микрофлору. Одной из групп таких веществ являются антимикробные пептиды (АМП) – низкомолекулярные соединения, построенные из аминокислот и имеющие катионную или амфипатическую природу, которые синтезируются в организме большинства эукариот в ответ на внедрение чужеродных микроорганизмов. К ним относятся дефензины, которые имеют большие перспективы применения в качестве антимикробных препаратов, так как

характеризуются высокой противомикробной активностью, безопасностью и отсутствием формирования с течением времени резистентности [1, 2]. Известно, что АМП являются одними из ключевых молекул врожденного иммунитета, обеспечивающих противомикробную защиту организма. Кроме антимикробного действия, АМП проявляют широкий спектр других биологических эффектов, что дает основание причислять их к биомодуляторным соединениям. АМП участвуют в процессах ранозаживления, способны связывать эндотоксины и проявлять противоопухолевое действие.

Для корреспонденции:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

Статья поступила 10.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

For correspondence:

Igor A. Bazikov, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of microbiology of Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

The article was received 10.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

Таблица 1. Данные об остаточном количестве фракции дефензина-альфа (пик 1) и фракций других дефензинов (пики 2, 3, 4)

Пик	Время, мин	Компонент	Конц., мкг/мл	Высота	Площадь	Полуширина
1	2,52	дефензин-альфа 1	0,038	13,503	288,288	16,907
2	3,27	фракции других дефензинов		3,748	74,265	18,617
3	3,82	фракции других дефензинов		0,816	26,851	21,490
4	5,61	фракции других дефензинов		1,976	30,067	14,199

Таблица 2. Данные хроматограммы фракции с наибольшим содержанием дефензина-альфа 1

Пик	Время, мин	Компонент	Конц., мкг/мл	Высота	Площадь	Полуширина
1	0,28			1,249	297,730	17,732
2	2,69	Дефензин-альфа 1	0,335	83,363	2574,624	27,460
3	3,32			92,425	1454,809	13,406

В этой связи АМП являются перспективными молекулами-прототипами для создания новых лекарственных препаратов. Однако основным недостатком является высокая стоимость рекомбинантного синтеза АМП для полномасштабного производства конечного продукта.

Встречающиеся в природе пептиды часто не подходят для использования в качестве терапевтических средств, так как имеют ряд недостатков, включая химическую и физическую нестабильность, а также короткий период полувыведения в циркулирующей плазме крови. Некоторые из этих недостатков могут быть успешно устранены с помощью выделения эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови и их инкапсулирования в наноконтейнеры с последующей разработкой на этой основе ниосомальных гелей. Это позволит увеличить биодоступность, снизить себестоимость и повысить эффективность воздействия на антибиотикорезистентные микроорганизмы. Предварительно нами разработаны методики инкапсулирования лекарственных веществ в кремнийорганические ниосомы [3–6]. В том числе был получен гель, содержащий рекомбинантные синтетические дефензины HNP-1 и HBD-1, инкапсулированные в кремнийорганические наноконтейнеры [7]. Однако его продвижение на фармацевтический рынок представляется проблематичным из-за высокой стоимости рекомбинантных дефензинов. В этой связи стоит задача разработка технологии получения АМП из клеток крови для создания фармацевтических композиций с пролонгированной эффективностью при антибиотикорезистентности. Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение возможности выделения эндогенных АМП из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров и инкапсулирование их в кремнийорганические ниосомы для дальнейшего изучения антимикробной активности при ранозаживлении, осложненном антибиотикоустойчивыми микроорганизмами.

Материалы и методы

В качестве сырья для получения эндогенных АМП использовали лейкоцитарно-тромбоцитарную массу крови доноров. Отобранная для переработки лейкоцитарно-тромбоцитарная масса проходила вирусологический контроль (на отсутствие HBS-антител к вирусу гепатита В, антител к вирусу гепатита С и ВИЧ), имела pH $6,81 \pm 0,23$, содержание аминного азота $249,90 \pm 36,35$ мг %. Гидролизат получали ферментативным гидролизом с использованием 10 мл стерильного раствора трипсина (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург,

Россия) на 100 мл гидролизуемой смеси в течение 1 ч в растворе фосфатного буфера (pH 7,4). Гидролизат осветляли 0,6%-м раствором перекиси водорода. Гель-фильтрацию полученного гидролизата проводили с помощью разделительной колонки, на дне которой находился мелкопористый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, и 30 г Сефадекса G-25. Первую фракцию удаляли. Затем проводили гель-фильтрацию на колонке с раствором фосфатного буфера (pH 7,4). Отбирали пробу с максимальным содержанием антибактериальных пептидов массой 3–5 кДа. Для определения максимальной концентрации АМП в полученных образцах проб использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Люмахром» (Россия) при длине волны 214 нм. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буфер (pH 7,4). Скорость подачи подвижной фазы 150 мм³/мин. Для построения калибровочной кривой использовали стандарт дефензина-альфа 1 из наборов Cloud-Clone Corp. (США) [8, 9].

В дальнейшем АМП инкапсулировали в кремнийорганические ниосомы и получали ниосомальный гель для изучения его антимикробной активности при ранозаживлении диабетических язв, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорганизмами. В полученный раствор АМП поэтапно добавляли 100 мл сополимера полидиметилсилоксана и эфира полиоксипалкилена (ПЭГ-12 диметикона) и 400 мл воды. Получение ниосом и инкапсулирование в АМП проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом перемешивании на шейкере PSU-20i со скоростью 200 об./мин в течение 10 минут. Для формирования ниосом более мелких размеров смесь интенсивно перемешивали с использованием гомогенизатора APV-2000 (Германия). Для формирования ниосом размерами 80–100 нм ранее полученную дисперсию ниосом с инкапсулированными дефензинами помещали в сосуд для ультразвуковой обработки. Использовали следующий режим озвучивания: частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт; время экспозиции – 15 минут. Для сохранения физико-химических характеристик ниосом использовали 50 мл гелеобразователя Covasyl MV 60 и 20 мл триэтаноламина. Общий объем геля доводился до 1000 мл дистиллированной водой [10, 11].

Результаты и обсуждение

Фракции с наибольшим содержанием АМП отбирали на основе предварительно определенных стандартных рекомбинантных дефензинов из наборов Cloud-Clone Corp. (США).

На рисунке 1 представлен калибровочный график определения дефензина-альфа 1, где по оси абсцисс указана концентрация АМП, а по оси ординат – площадь пика оптической плотности. Полученную фракцию низкомолекулярных пептидов стерилизовали фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. На рисунке 2 представлена хроматограмма общей фракции АМП. Помимо дефензина-альфа во фракции присутствовали и другие виды дефензинов. В дальнейшем полученные пептиды подвергали лиофильному высушиванию. На рисунке 3 представлена хроматограмма фракции с наибольшей концентрацией дефензина-альфа 1.

Полученные результаты показали, что использование в качестве исходного сырья лейкоцитарно-эритроцитарно-

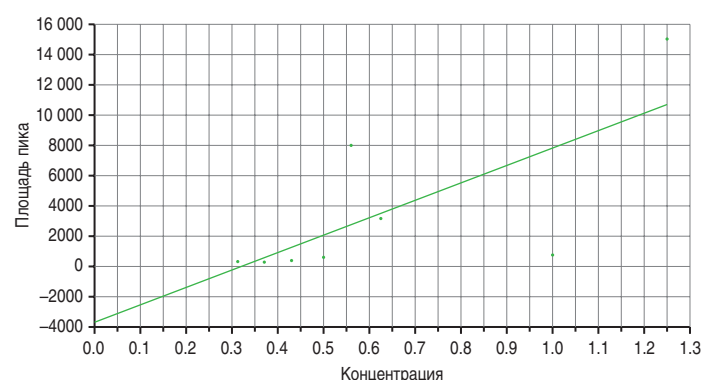


Рис. 1. Калибровочный график определения концентрации стандарта дефензина-альфа 1.

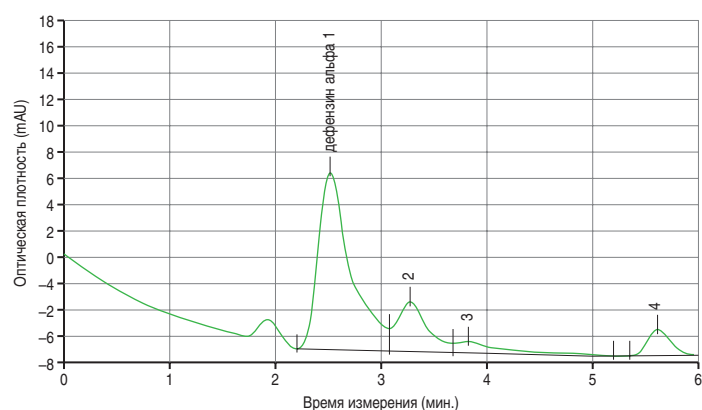


Рис. 2. Хроматограмма общей фракции АМП, полученной из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови.

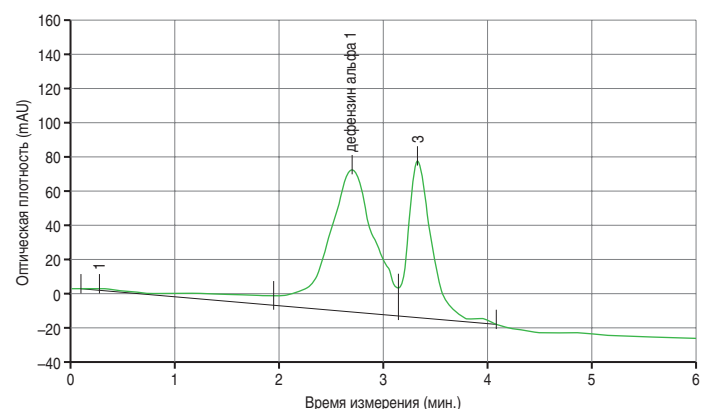


Рис. 3. Хроматограмма фракции с наибольшей концентрацией дефензина-альфа 1.

тромбоцитарной массы крови доноров и разделительной колонки с Сефадексом G-25 позволяло оптимизировать технологию выделения фракций с наибольшим содержанием в ней эндогенных АМП.

Данный способ обеспечивал получение 200 мл фракции, содержащей дефензин-альфа 1 в концентрации 0,335 мкг/мл. Применение данного метода позволяло несколько раз использовать Сефадекс G-25 после промывки, регенерации и высушивания.

Такая технология в перспективе будет значительно снижать стоимость фармацевтических композиций с содержанием выделенных эндогенных АМП.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Larijani B, Hasani SR. Overview of diabetic foot; Novel treatments in diabetic foot ulcer; DARU 2008; 16 (Suppl. 1);1-6.
2. Ashtikar M, Wacke MG. Nanopharmaceuticals for wound healing – Lost in translation. Adv Drug Deliv Rev. 2018;129:194-218. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.005
3. Базиков ИА, Мальцев АН. Кремнийорганические ниосомы с бактерицидными и парамагнитными свойствами. Патент на изобретение RUS 2625722 18.07.2017.
4. Базиков ИА, Аксенов АВ, Аксенов НА, Мальцев АН, Смирнов АН. Фармацевтический ниосомальный гель на основе вещества п-гидрокси-2-(2-(нафтален-2-ил)-1h-индол-3-ил)-2-фенилацетамид с противоопухолевой активностью к глиобластоме. Патент на изобретение RUS 2627449 04.08.2017.
5. Базиков ИА, Аксенов АВ, Мальцев АН, Селимов МА, Корниенко АВ, Аксенов АН, Аксенова ИВ, Базиков ФИ. Свойства разработанной ниосомальной формы противоопухолевого вещества N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide для лечения глиобластомы. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(2):196-9.
6. Diskaeva EI, Vecher OV, Bazikov IA, Maltsev AN. Dispersion analysis of niosomes different composition. Journal of Nanoparticle Research. 2019;21(1):2049.
7. Мальцев АН, Базиков ИА, Батурин ВА, Ефременко АА, Лысогора ЛВ. Выделение природных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови. Сборник материалов VI Всероссийской научной-практической конференции с международным участием. Москва, 29 ноября 2019, 138 с.
8. Болатчиев АД, Батурин ВА, Базиков ИА. Антимикробный гель для лечения инфицированных ран, ожогов и трофических язв. Патент на изобретение RUS 2655522 от 28.05.2018.
9. Базиков ИА, Мальцев АН, Седых ОИ. Разработка ниосомального лекарственного геля с альфа- дефензином hnp-1. Болатчиев А.Д. В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4-й международной научно-практической конференции. Ставрополь, 2018, с. 87-89.
10. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN. Effect of niosomal antimicrobial peptide hbd-1 on the healing rate of infected wounds in rats. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2018;13(3):515-517.

11. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo*. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2019. DOI: 10.1111/fcp.12499

References

1. Larijani B, Hasani SR. Overview of diabetic foot; Novel treatments in diabetic foot ulcer; DARU 2008; 16 (Suppl. 1);1-6.
2. Ashtikar M, Wacke MG. Nanopharmaceuticals for wound healing – Lost in translation. Adv Drug Deliv Rev. 2018;129:194-218. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.005
3. Bazikov IA, Maltsev AN. Silicone niosomes with bactericidal and paramagnetic properties. Patent for invention RUS 2625722 18.07.2017. (In Russian).
4. Bazikov IA, Aksenov AV, Aksenov NA, Maltsev AN, Smirnov AN. Pharmaceutical niosomal gel on the basis of the substance n-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide with the antineoplastic activity to the glioblastoma. Patent for invention RUS 2627449 04.08.2017. (In Russian).
5. Bazikov IA, Aksenov AV, Maltsev AN, Selimov MA, Korniyenko AV, Aksenov AN, Aksenova IV, Bazikov FI. Properties of the developed niosomal form of the antineoplastic substance N-hydroxy-2-(2 (naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide for treatment of the glioblastoma. Medical News of the North Caucasus. 2016;11(2):196-9. (In Russian).
6. Diskaeva EI, Vecher OV, Bazikov IA, Maltsev AN. Dispersion analysis of niosomes different composition. Journal of Nanoparticle Research. 2019;21(1):2049.
7. Maltsev AN, Bazikov IA, Baturin VA, Efremenko AA, Lysogora LV. Isolation of natural antimicrobial peptides from leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass. Materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation. Moscow, November 29, 2019 P.138. (In Russian).
8. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA. Antimicrobial gel for treatment of infected wounds, burns and trophic ulcers. Patent for the invention RUS 2655522 dated 28.05.2018. (In Russian).
9. Bazikov IA, Maltsev AN, Sedykh OI. Development of niosomal drug gel with alpha-defensin hnp-1. Bolatchiev A.D. In the collection: Biotechnology: a look to the future. Stavropol 2018, pp. 87-89. (In Russian).
10. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN. Effect of niosomal antimicrobial peptide hbd-1 on the healing rate of infected wounds in rats. Medical News of the North Caucasus. 2018;13(3):515-7.
11. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo*. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2019. DOI:10.1111/fcp.12499

Информация об авторах:

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник, заведующий лабораторией биологически активных веществ и нанотехнологий центра фармакологии, морфологии и биотехнологии научно-инновационного объединения ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310 Телефон: (8652) 35-2475

Седых Ольга Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории биологически активных веществ и нанотехнологий центра фармакологии, морфологии и биотехнологии научно-инновационного объединения ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310 Телефон: (8652) 35-2475

Батурин Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии, аллергологии и иммунологии с курсом ПДО, ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310 Телефон: (8652) 71-3466

Болатчиев Альберт Добаевич, аспирант, ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310 Телефон: (8652) 35-2475

Ефременко Анна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310 Телефон: (8652) 35-2475

Information about authors:

Alexander N. Maltsev, PhD (Biology), researcher, head of the laboratory of biologically active substances and nanotechnologies of the Center of Pharmacology, Morphology and Biotechnology of the Scientific and Innovative Association, Stavropol State Medical University Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation Phone: (8652) 35-2475

Olga I. Sedykh, associate researcher of the laboratory of biologically active substances and nanotechnologies of the Center of Pharmacology, Morphology and Biotechnology of the Scientific and Innovative Association, Stavropol State Medical University Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation Phone: (8652) 35-2475

Vladimir A. Baturin, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of clinical pharmacology, allergology and immunology, Stavropol State Medical University Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation Phone: (8652) 71-3466

Albert D. Bolatchiev, postgraduate student, Stavropol State Medical University Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation Phone: (8652) 35-2475

Anna A. Efremenko, MD, PhD, associate professor of the department of microbiology, Stavropol State Medical University Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation Phone: (8652) 35-2475

НОВЫЕ КНИГИ



Право и современные технологии в медицине / под ред. А.А.Мохова, О.В.Сушкова //
Издательство «Проспект». – 2019. – 368 с. – ISBN 978-5-9988-0954-5

В настоящем издании рассматривается комплекс правовых проблем, обусловленных стремительным развитием современных технологий в медицине (генетических, информационных, репродуктивных и иных), появлением новых лекарственных препаратов для медицинского применения, биомедицинских клеточных продуктов и иных средств медицинского применения. Кроме того, в книге затрагиваются экологические аспекты появляющихся и внедряемых технологий, способных оказать существенное влияние на различные сферы человеческой деятельности, среду его обитания, биосферу. Настоящая монография является итогом работы Международного симпозиума «Право и современные технологии в медицине», который прошел в Московском государственном юридическом университете им. О.Е.Кутафина (МГЮА) 15–17 мая 2019 г. Законодательство представлено по состоянию на 15 мая 2019 г. Книга рассчитана на широкий круг читателей, так как носит междисциплинарный характер. Монография может быть рекомендована преподавателям, ученым, практическим работникам, адвокатам, аспирантам, студентам как юридических, так и медицинских и иных вузов, а также всем, кто интересуется проблемами предпринимательской, экологической, медицинской и иных сфер жизни общества.

Исследование взаимодействия антигенов и компонентов матрикса трансдермального варианта вакцин

М.Н.Киреев, М.В.Овчинникова, О.А.Волох, С.В.Борисова, А.К.Никифоров

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

В статье представлены результаты модельных экспериментов по изучению влияния компонентов матрикса трансдермального варианта вакцин и потенциальных вспомогательных веществ на активность антигенов, входящих в вакцину. **Ключевые слова:** природные биополимеры, энансеры, трансдермальные вакцины

Для цитирования: Киреев М.Н., Овчинникова М.В., Волох О.А., Борисова С.В., Никифоров А.К. Исследование взаимодействия антигенов и компонентов матрикса трансдермального варианта вакцин. Бактериология. 2020; 5(1): 37–40. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-37-40

Investigation of interactions between antigens and matrix components of transdermal vaccine candidates

M.N.Kireev, M.V.Ovchinnikova, O.A.Volokh, S.V.Borisova, A.K.Nikiforov

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

The paper presents the results of model experiments to study the effect of matrix components of transdermal vaccine candidates and prospective auxiliary substances on the activity of antigens included in the vaccine. **Key words:** natural biopolymers, enhancer, transdermal vaccines

For citation: Kireev M.N., Ovchinnikova M.V., Volokh O.A., Borisova S.V., Nikiforov A.K. Investigation of interactions between antigens and matrix components of transdermal vaccine candidates. Bacteriology. 2020; 5(1): 37–40. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-37-40

Актуальность разработки нового поколения профилактических препаратов для предотвращения инфекционных болезней не вызывает сомнения. Одним из направлений по созданию новых вакцин является конструирование чрескожных вариантов вакцин. Такой подход может осуществляться при использовании трансдермальных конструкций, содержащих в своем составе иммуногенные антигены соответствующих возбудителей и вспомогательные вещества.

В настоящее время все большее внимание уделяют альтернативным способам введения в организм пациента лечебных и профилактических препаратов, в том числе вакцин. Для ряда инфекций перспективным является применение трансдермального способа введения. При создании таких препаратов наиболее подходящими материалами, на наш взгляд, являются композиции из природных полимеров животного и растительного происхождения – хитозана и аль-

гината натрия. Они обладают рядом свойств, которые будут полезны для биотехнологов [1–6].

Предварительно мы изучили возможность применения материалов из природных полисахаридных биополимеров в качестве контейнеров или матрикс-депо для компонентов химических вакцин – антигенов [7]. Было показано, что взятые в опыт биополимеры не снижают иммунохимическую активность антигенов. Напротив, благодаря своим уникальным свойствам они могут качественно улучшить свойства создаваемого препарата. Так, хитозан обладает бактерицидной активностью, биоциден, тормозит развитие грибов, совместим с тканями человека, обладает адьювантным действием, биodeградируется полностью до простых сахаров, которые выводятся из организма. Все эти свойства биотехнологи могут изменять (ослаблять или усиливать) и использовать в создаваемых вакцинах.

Для корреспонденции:

Киреев Михаил Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 51-5446

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 30.01.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

For correspondence:

Mikhail N. Kireev, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»

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

Phone: (8452) 51-5446

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 30.01.2020, accepted for publication 27.03.2020

Материалы и методы

Для конструирования прототипа вакцинного пластыря мы использовали различные варианты нетканого полотна, полученного из нановолокон хитозана электроформированием. Данный материал будет производиться в инновационно-технологическом центре Саратовского государственного университета «Перспективные материалы». В качестве биологически активного компонента использовали капсульный антиген чумного микроба. Такой выбор не случаен, поскольку данный антиген хорошо изучен, это основной иммуноген возбудителя чумы, он является важнейшей составной частью большинства чумных профилактических и диагностических препаратов и, что не менее важно, ранее мы показали, что он сохраняет свои биологические и иммунологические свойства в течение длительного периода даже при комнатной температуре [8]. Такие характеристики, на наш взгляд, позволяют говорить о возможности использования этого антигена для конструирования трансдермального варианта химической вакцины.

Для модельного эксперимента антигеном пропитывали подложку из нетканого хитозанового полотна, высушива-

ли и затем вносили в лунку чашки с агаром для реакции иммунодиффузии. Было показано, что антиген постепенно выходит из подложки и образует линию преципитации, соответствующую нативному, не связанному с подложкой антигену. Это говорит о том, что связь F1 с нановолокнами хитозана не ковалентная, а обусловлена адсорбционными взаимодействиями, причем линии преципитата появлялись с задержкой относительно лунки со свободным антигеном.

При выполнении следующего этапа работы мы определили влияние ряда вспомогательных веществ (энхансеров) и методов физического воздействия на антиген.

Для повышения проницаемости кожи применяют химические вещества, слабые электрические поля, ультразвуковое воздействие. Как известно, местное действие некоторых веществ на кожу повышает ее проницаемость для других лекарственных средств, что увеличивает их всасывание и ускоряет лечебный эффект. Мы изучили два разрешенных фармацевтических препарата, диметилсульфоксид (ДМСО) и салициловую кислоту, применяемые в том числе для увеличения проницаемости кожи. ДМСО использовали в концентрации 1–10%. Салициловую кислоту, предварительно растворенную в ДМСО, добавляли до конечной концентрации 0,5–5%. Затем проверили влияние ультразвука на иммунохимическую активность антигена.

Для определения влияния энхансеров в качестве простейшего аналога эпидермиса использовали тонкий слой 1%-й агарозы, как при реакции иммунодиффузии в геле. Для подтверждения сохранения иммунохимической активности антигена после воздействия ультразвука проводили высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и дот-иммуноанализ.

Результаты и обсуждение

Трансдермальный вариант химических вакцин перспективен еще тем, что в слои подложки с активными компонентами – антигенами – можно добавлять лекарственные вещества, стимулирующие иммуногенез, повышающие прохождение антигенов через кожу и всасывание препаратов. При конструировании изделий медицинского назначения, основанных на принципах адсорбции антигенов, анатоксинов, ферментов, с дальнейшим использованием биологической активности этих компонентов в макроорганизме (вакцины, лекарственные препараты), принципиально важно, что природные биополимеры и вспомогательные вещества при своей биоинертности практически не изменяют основные характеристики биологически активных веществ – антигенов, но в тоже время обладают адъювантным действием и бактерицидной активностью.

В результате проведенных экспериментов показано, что ДМСО в концентрации от 1 до 10% и салициловая кислота в концентрации от 0,5 до 5% не влияют на иммунохимическую активность антигена (рис. 1, 2).

Обработка антигена ультразвуком показала увеличение титра в дот-иммуноанализе с антисывороткой. При исследовании антигена в аналитической ВЭЖХ показано, что высокомолекулярный пик капсульного антигена снижается и появляется второй, низкомолекулярный пик. Как



Рис. 1. Анализ иммунохимической активности антигена после инкубации с разными концентрациями ДМСО. (1) – 1%, (2) – 2%, (3) – 4%, (4) – 5%, (5) – 10%, (6) – контроль 10% ДМСО без антигена, (7) – антисыворотка.

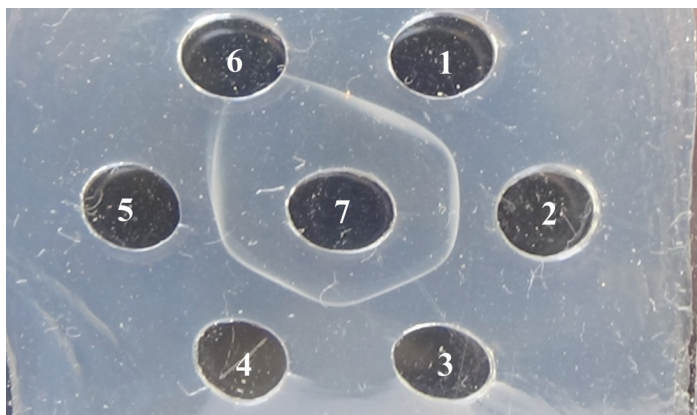


Рис. 2. Анализ иммунохимической активности антигена после инкубации с разными концентрациями салициловой кислоты. (1) – 0,5%, (2) – 1%, (3) – 2%, (4) – 3%, (5) – 5%, (6) – контроль 5%-я салициловая кислота без антигена, (7) – антисыворотка.

известно, капсульный антиген чумного микроба является полимером, состоящим из мономерных звеньев. При ультразвуковом воздействии происходит отделение мономеров, что влечет за собой увеличение иммунохимической активности.

В результате проведенного исследования показано, что изученные энхансеры ДМСО и салициловая кислота не влияют на взаимодействие антигена с иммуноглобулинами, а обработка ультразвуком повышает иммунохимическую активность капсульного антигена. В случае конструирования трансдермальных лечебных и профилактических лекарственных препаратов композит из природных биополимеров составит каркас такого кожного пластыря или сорбента, а активные компоненты вакцины – антигены – и энхансеры, или усилители всасывания, будут включенной в него матрицей. Такие вакцинные препараты могут находиться в индивидуальных аптечках и применяться в условиях чрезвычайных ситуаций, при отсутствии чистой воды и квалифицированного медицинского персонала.

Таким образом, применение природных биополимеров позволит создавать более эффективные лечебные и профилактические препараты с незначительным побочным действием. Рациональное использование вспомогательных веществ (энхансеров) даст возможность биотехнологам потенцировать действие активных компонентов вакцины, увеличить всасываемость антигенов, что позволит снизить антигенную нагрузку с сохранением терапевтического эффекта. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения описанных биотехнологических подходов при разработке новых и усовершенствовании имеющихся профилактических препаратов.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Гендон ЮЗ, Маркушин СГ, Кривцов ГГ, Аكوпова ИИ. Хитозан как адъювант для инактивированных гриппозных вакцин, вводимых парентерально. Вопросы вирусологии. 2008;53(5):14-9.
- Гендон ЮЗ, Васильева ЮМ, Маркушин СГ, Аكوпова ИИ, Коптяева ИБ, Кривцов ГГ. Хитозан как адъювант для инактивированных вакцин против вирусов гриппа птиц. Журнал микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. 2009;2:40-7.
- Васильев ЮМ. Адъюванты гриппозных вакцин – современное состояние. Журнал микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. 2010;1:100-10.
- Шиповская АБ, Фомина ВИ, Киреев МН, Казакова ЕС, Касьян ИА. Биологическая активность олигомеров хитозана. Известия Саратовского университета. Химия. Биология. Экология. 2008;8(2):46-9.
- Избранные труды по комбустологии. Под ред. Н.В.Островского. Изд-во «Научная книга»; 2009.

- Miksza JA, Dekker JP, Harvey NG, et al Microneedle-based intradermal delivery of the anthrax recombinant protective antigen vaccine. Infect Immun. 2006 Dec; 74(12):6806-10. DOI: 10.1128/IAI.01210-06
- Киреев МН, Волох ОА, Никифоров АК. Композиты на основе природных биополимеров: свойства и перспективы применения при создании трансдермальных форм вакцин. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016;1(14):70-4.
- Киреев МН, Тараненко ТМ, Храменкова ТА, и др. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения. Биотехнология. 2005;5:41-3.

References

- Gendon YuZ, Markushin SG, Krivtsov GG, Akopova II. Chitosan as an adjuvant for parenteral inactivated influenza vaccines. Problems of Virology, Russian Journal. 2008;53(5):14-9. (In Russian).
- Gendon YuZ, Vasilyev YuM, Markushin SG, Akopova II, Koptayeva IB, Krivtsov GG. Chitosan as an adjuvant for inactivated vaccines against avian influenza viruses. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2009;2:40-7. (In Russian).
- Vasilyev YuM. Influenza vaccines adjuvants – contemporary state. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2010;1:100-10. (In Russian).
- Shipovskaya AB, Fomina VI, Kireev MN, Kazakova ES, Kasi'yan IA. Biological Activity of Chitosan Oligomers. Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology. 2008;8(2):46-9. (In Russian).
- Izbrannye trudy po kombustologii. Edited by N.V.Ostrovskii. Moscow: «Nauchnaya kniga» Publ.; 2009. (In Russian).
- Miksza JA, Dekker JP, Harvey NG, et al Microneedle-based intradermal delivery of the anthrax recombinant protective antigen vaccine. Infect Immun. 2006 Dec;74(12):6806-10. DOI: 10.1128/IAI.01210-06
- Kireev MN, Volokh OA, Nikiforov AK. Natural biopolymer-based composites: properties and prospects of utilization in constructing transdermal formulation of vaccines. Drug development & registration (Razrabotka i registraciâ lekarstvennykh sredstv). 2016;1(14):70-4. (In Russian).
- Kireev MN, Taranenko TM, Kravtsov AL, Guseva NP, Polunina TA, Sharapova NA, Klyueva SN, Shmelkova TP. Structural and functional properties of the capsular antigen F1 preparations during of a long-time storage. Biotekhnologiya (Biotechnology). 2005;5:41-3. (In Russian).

Информация об авторах:

Овчинникова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая отделом диагностических препаратов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusapi@microbe.ru

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

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

Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук, заместитель директора по экспериментальной и производственной работе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusapi@microbe.ru

Information about authors:

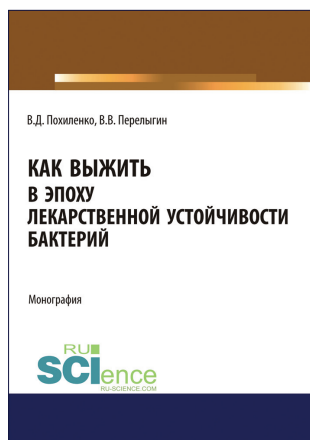
Maria V. Ovchinnikova, PhD (Biology), head of the department of diagnostic preparations, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

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

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

Alexey K. Nikiforov, Dr. Sci. (Biology), Deputy Director for experimental and industrial work, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

НОВЫЕ КНИГИ



Похиленко В.Д. Как выжить в эпоху лекарственной устойчивости бактерий / В.Д.Похиленко, В.В.Перелыгин // М.: РУСАЙНС. – 2019. – 94 с. – ISBN 978-5-4365-3540-1

Предмет исследования – штамм *Bacillus subtilis* ПСФ-19, выделенный нами из растительно-го сырья (препарат «Пассифлора»), который способен продуцировать антимикробное вещество (АМВ), подавляющее патогенные бактерии. В статье рассматриваются способ и условия извлечения из культуральной жидкости фракции АМВ, активного против *Listeria monocytogenes* – одного из опасных кишечных патогенов, инфицирующих пищевые продукты. С помощью биохимических методов и масс-спектрологии определена молекулярная масса и установлена пептидная природа активной фракции АМВ. Бактерицидной активностью обладает фракция АМВ с молекулярной массой около 3,4–3,6 кДа, которая разрушается при обработке протеолитическими ферментами, что позволило отнести ее к группе низкомолекулярных антимикробных пептидов – бактериоцинов. Проведенные исследования позволяют рассматривать штамм *Bacillus subtilis* ПСФ-19 в качестве продуцента бактериоцина, особенно эффективного против возбудителей кишечных лишерозов. Установление факта разрушаемости протеолитическими ферментами, нахождение условий микробиологического синтеза АМВ, его выделения и накопления для исследований предоставляют возможности практического использования в качестве средства для деконтаминации среды обитания взамен традиционным антибиотикам.

Проведенные исследования позволяют рассматривать штамм *Bacillus subtilis* ПСФ-19 в качестве продуцента бактериоцина, особенно эффективного против возбудителей кишечных лишерозов. Установление факта разрушаемости протеолитическими ферментами, нахождение условий микробиологического синтеза АМВ, его выделения и накопления для исследований предоставляют возможности практического использования в качестве средства для деконтаминации среды обитания взамен традиционным антибиотикам.



Экологические средства борьбы с патогенами человека, животных и растений / Воложанцев Н.В., Дунайцев И.А., Дятлов И.А. [и др.]; под редакцией И.А.Дятлова; Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. – Оболенск; Москва: Буки Веди, 2019. – 231 с.: ил.; 25 см. – Библиогр. в конце гл. – 500 экз. – ISBN 978-5-4465-2414-3 (в пер.)

В монографии обобщены данные литературы и результаты собственных исследований коллектива ученых ФБУН ГНЦ ПМБ по разработке экологических средств оздоровления среды обитания человека, охраны его здоровья и методов борьбы с патогенами человека, животных и растений. Обсуждаются возможности применения вирусов бактерий (бактериофагов), микробов-антагонистов и их антимикробных субстанций, а также низкотемпературной плазмы для снижения численности патогенов в окружающей среде и среде обитания человека. В работе приводятся теоретические и практические аспекты исследований, выполненных в ГНЦ ПМБ в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования

и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011–2015 гг.) и выполняемой в настоящее время программы «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (на 2016–2020 гг.).

Предложенный труд может быть полезен ученым, преподавателям, студентам физических, химических, биологических и медицинских факультетов, а также специалистам здравоохранения.

Сравнительный анализ питательных сред для определения биохимических свойств энтеробактерий

О.В.Полосенко, А.П.Шепелин

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

Этап идентификации микроорганизмов является одним из самых важных и трудоемких этапов проведения бактериологических исследований. На питательных средах при первичном выделении по сочетанию биохимических признаков можно выявить одновременно несколько родов энтеробактерий. Поэтому важным условием эффективности бактериологических исследований по выделению представителей семейства *Enterobacteriaceae* является адекватный выбор и качество питательных сред. Это позволяет определить фенотипические свойства выросших культур микроорганизмов и правильно их идентифицировать. Проведена сравнительная оценка биологических свойств ряда современных питательных сред с целью определения культурально-морфологических и биохимических свойств энтеробактерий.

Ключевые слова: питательные среды, энтеробактерии, фенотипические признаки, биохимические свойства, дифференцирующие свойства, селективность

Для цитирования: Полосенко О.В., Шепелин А.П. Сравнительный анализ питательных сред для определения биохимических свойств энтеробактерий. Бактериология. 2020; 5(1): 41–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-41-47

Comparative analysis of nutrient media for determination of the biochemical properties of *Enterobacteria*

O.V.Polosenko, A.P.Shepelin

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

The stage of identification of microorganisms is one of the most important and time-consuming stages of conducting bacteriological studies. On nutrient media with primary isolation by a combination of biochemical characteristics, several genera of enterobacteria can be detected simultaneously. Therefore, an important condition for the effectiveness of bacteriological studies to isolate representatives of the *Enterobacteriaceae* family is an adequate selection and quality of culture media. This allows you to determine the phenotypic properties of the grown cultures of microorganisms and correctly identify them.

A comparative assessment of the biological properties of a number of modern nutrient media was carried out to determine the cultural-morphological and biochemical properties of enterobacteria.

Key words: nutrient media, enterobacteria, phenotypic features, biochemical properties, differentiating properties, selectivity

For citation: Polosenko O.V., Shepelin A.P. Comparative analysis of nutrient media for determination of the biochemical properties of *Enterobacteria*. Bacteriology. 2020; 5(1): 41–47. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-41-47

Изучение бактериальных культур, причастных к возникновению болезни, начинают с анализа комплекса фенотипических признаков. Результаты исследования фенотипических свойств выделенного микроорганизма служат базой для его родовой и видовой идентификации, а также для решения основного вопроса: играет ли данный микро-

организм этиологическую роль (если он относится к категории патогенных) в диагностируемой инфекции [1].

Важнейшими фенотипическими свойствами, проявляемыми культурой микроорганизма, являются биохимические свойства (наличие ферментов, участвующих в расщеплении белков, углеводов, вызывающих восстановление или окис-

Для корреспонденции:

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. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: polosenko@obolensk.org

Статья поступила 03.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

For correspondence:

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

The article was received 03.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

ление различных субстратов), тинкториальные свойства (свойство бактерий вступать в реакцию с красителями и окрашиваться определенным способом), образование колоний на плотных питательных средах.

Различия в ферментном составе используются для дифференциации микроорганизмов, так как они определяют их различные биохимические свойства: сахаролитические (бактерии характеризуются неодинаковой способностью использовать различные углеводы), протеолитические (разложение белков) и другие, выявляемые по конечным продуктам расщепления (образование щелочей, кислот, сероводорода, аммиака и др.).

У бактерий различают три основные группы ферментов. Конститутивные ферменты синтезируются клеткой непрерывно, вне зависимости от наличия субстратов в питательной среде. Индуцибельные (адаптивные) ферменты синтезируются только при наличии в среде субстрата данного фермента. Так, кишечная палочка на среде с глюкозой практически не образует β -галактозидазу, но при добавлении в питательную среду лактозы резко увеличивает синтез этого фермента. Репрессибельные ферменты – синтез которых подавляется в результате избыточного накопления продукта реакции, катализируемой данным ферментом [2].

За последние годы предложены и апробированы эффективные и научно обоснованные методы выделения и идентификации энтеробактерий. Разработаны и внедрены в производство новые диагностические препараты: питательные среды, сыворотки, высокоспецифические диагностикумы, системы для ускоренной идентификации, препараты бактериофагов и другие реагенты.

Тем не менее культуральный метод при идентификации выделенных энтеробактерий по биохимическим свойствам до уровня рода и вида является важным этапом в практической деятельности любой микробиологической лаборатории.

Изучение биохимических свойств непосредственно в лабораториях связано с важными манипуляциями по приготовлению специальных диагностических питательных сред, требующих соблюдения строго заданных условий. Среда должна обязательно содержать быстро усваиваемые вещества, нужные для обеспечения метаболических и энергетических нужд микробов, факторы роста (витамины, аминокислоты), иметь нужную концентрацию водородных ионов (рН), влияющих на транспортные процессы клеточной мембраны и позволяющих клетке усваивать полезные вещества из среды, иметь достаточный окислительно-восстановительный потенциал, и другие вещества, способные поддерживать рост или сохранение жизнеспособности конкретных микроорганизмов. Селективные среды должны содержать в составе ингибиторы, угнетающие рост сопутствующих микроорганизмов (желчь, бриллиантовый/малахитовый зеленый, антибиотики и др.). Дифференцирующие свойства питательных сред создаются внесением субстрата, позволяющим анализировать одну или несколько физиологических/биохимических характеристик микроорганизмов (например, сахаров, аминокислот и др.) с соответствующими индикаторами (фуксин, феноловый красный, бромтимоловый синий и др.).

При микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями в качестве питательных сред для первичного посева в соответствии с исследуемым материалом, как правило, используют: среду Плоскирева, висмут-сульфит агар, с антибиотиками (для выделения шигелл), ЭМС (агар с эозин-метиленовым синим), ЭТ-2 (для выделения эдвардсиелл), Эндо; среды (бульоны) обогащения: магниевую, селенитовый, желчный бульон или среду Рапопорт, глюкозный бульон, буферную (для иерсиний) и др. [3].

Питательные среды, способствующие идентификации или определению биохимических характеристик микроорганизмов, которые проводят после предварительных стадий выделения и/или обогащения, являются подтверждающими средами: среда Клигlera, Олькеницкого, трехсахарный агар и др. [4].

В современной бактериологической практике чаще всего используют сухие питательные среды, которые могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке и имеют относительно стандартный состав.

В настоящее время существующий широкий выбор современных питательных сред российского производства позволяет облегчить выделение и идентификацию энтеробактерий из исследуемого материала за счет высокой чувствительности, хороших дифференцирующих, ростовых и ингибирующих свойств сред [5–8].

Цель исследования – сравнительный анализ питательных сред для определения биохимических свойств энтеробактерий.

Материалы и методы

Использованы тест-штаммы энтеробактерий, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Биохимические свойства энтеробактерий определялись на питательных средах: лактозный ТТХ агар с тергитолом 7, XLD-агар, ГРМ-бульон, питательная среда № 15 ГРМ для определения индола, трипон-желчный агар (ТЖА), питательная среда с лизином. Специфическая активность питательных сред определялась в соответствии с действующей нормативной документацией. Идентификацию исследуемых тест-штаммов энтеробактерий по биохимическим свойствам проводили согласно МУ 04-723/3 «Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями» [3] и руководствуясь определителем «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» [9].

Результаты и обсуждение

Большое разнообразие родов и видов энтеробактерий создает определенные трудности в работе практических лабораторий при идентификации изолируемых штаммов энтеробактерий и заставляет изучать широкий набор биохимических признаков, их соответствие генотипу. Такие обстоятельства определяют постоянно возрастающие требования к работе бактериологов по выявлению и идентификации многочисленных представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

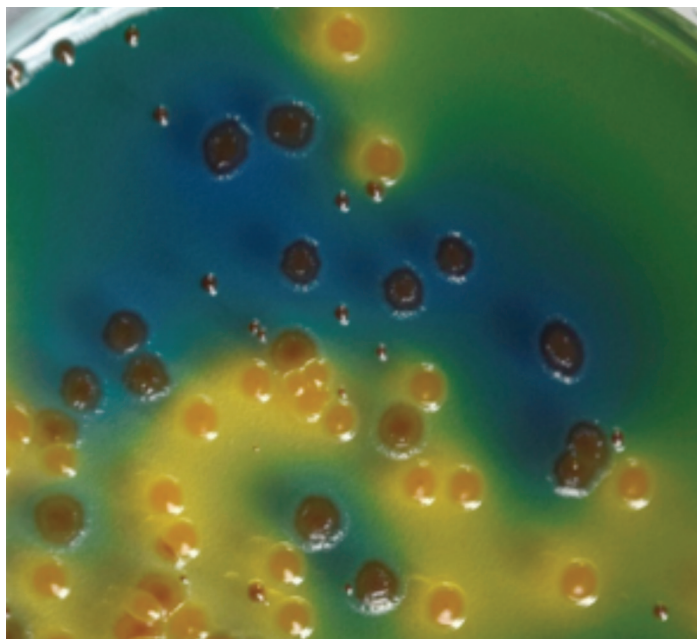


Рис. 1. Пост тест-штаммов *Salmonella typhimurium* 79 (крупные колонии коричневого цвета с посинением среды) + *E. coli* 3912/41 O55:K59 (колонии желтого цвета) + *Shigella flexneri* 1a 8516 (мелкие колонии коричневого цвета с посинением среды).



Рис. 2. Пост тест-штаммов: *Salmonella enteritidis* (черные колонии) + *E. coli* 3912/41 O55:K59 (желтые колонии) + *S. flexneri* 1a 8516 (розовые колонии).

Некоторые бактериологические лаборатории для выделения энтеробактерий традиционно используют классические питательные среды: среды Эндо, Плоскирева, SS-агар, Левина, МакКонки и др., которые являются слабо селективными, и при выделении чистых культур микроорганизмов возникают затруднения из-за присутствия в исследуемых образцах протей, способного к роению. Кроме того, на таких питательных средах при первичной идентификации по сочетанию биохимических признаков можно заподозрить одновременно несколько родов энтеробактерий.

При переходе классических к современным методам исследования большое значение приобретает унификация процедуры выполнения. Важную роль в этом играют: ускорение проведения анализов и улучшение воспроизводимости результатов.

Дифференциальные питательные среды нового поколения: питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар), лактозный ТТХ агар с тергитолом 7, ТЖА, позволяют не только расширить ассортимент сред для выделения энтеробактерий при первичном посеве, но и сократить сроки исследования, а также использовать меньший набор питательных сред при проведении исследований.

Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7 используется для обнаружения и учета *Escherichia coli* и колиформных бактерий при проведении бактериологических исследований и обеспечивает рост энтеробактерий, четкую дифференциацию сальмонелл от эшерихий и подавляет рост стафилококков.

Селективность среды обеспечивается гептадецилсульфатом натрия (Тергитол-7) и 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом (ТТХ), подавляющим большинство грамположительных бактерий. ТТХ играет роль также и дифференцирующего вещества, поскольку лактозоотрицательные бактерии

восстанавливают ТТХ, окрашиваясь в коричневый цвет. Изменяя pH в кислую сторону, лактозоферментирующие бактерии при росте образуют на среде колонии желтого или желто-оранжевого цвета с желтой зоной вокруг колоний. Такие ярко выраженные дифференцирующие свойства среды позволяют идентифицировать микроорганизмы уже на этапе первичного посева (рис. 1).

Для выделения шигелл бактериологическими лабораториями используются питательные среды с антибиотиками. Среда готовят путем добавления соответствующих препаратов антибиотиков к среде Плоскирева или ЭМС-агару (агар с эозин-метиленовым синим) [3].

Питательная среда XLD-агар позволяет одновременно выделять и дифференцировать патогенные энтеробактерии, в частности, сальмонеллы и шигеллы. Дифференцирующие свойства среды основаны на понижении pH среды в кислую сторону при росте ферментирующих углеводов бактерий, которые образуют на XLD-агаре беловато-желтые колонии, окруженные желтой зоной. Бактерии, декарбоксилирующие лизин с образованием кадаверина, обнаруживаются по пурпурному окрашиванию среды вокруг колоний вследствие повышения pH среды. Бактерии, продуцирующие в процессе роста на XLD-агаре сероводород, образуют колонии с черным центром. Образование черного цвета происходит в процессе химической реакции солей железа, входящих в состав среды, с сероводородом и образованием в результате реакции сульфида железа черного цвета (рис. 2).

Отобранные для дальнейшего изучения колонии пересевают в одну из сред для первичной идентификации.

Идентификация энтеробактерий включает три этапа: а) первичную идентификацию; б) установление рода (дифференциацию родов) и в) идентификацию вида и внутривидовую дифференциацию.

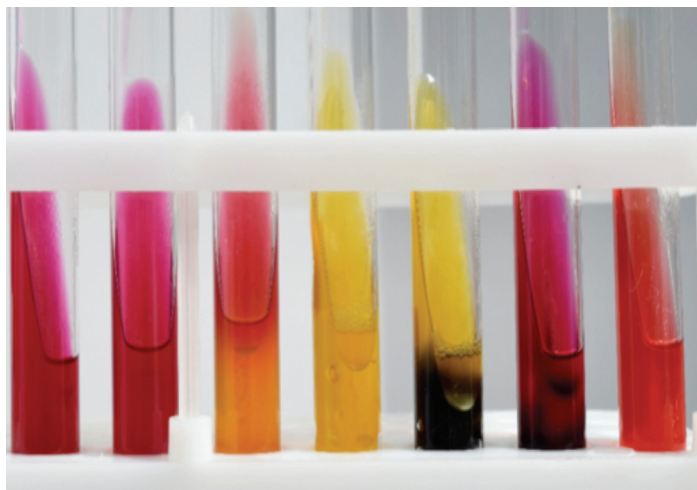


Рис. 3. Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной: слева направо: рост тест-штаммов *Yersinia enterocolitica* 287 II, *Yersinia pseudotuberculosis* III, *Shigella sonnei* «S form», *E. coli* 3912/41 (055: K59), *Citrobacter freundii* 101/57, *Proteus vulgaris* HX 19 222, контроль (незасеянная среда).

Выполнение первого этапа предусматривает определение биохимических признаков изучаемой культуры с использованием сред для первичной идентификации (комбинированных сред), а при необходимости и тестов для дифференциации энтеробактерий от других грамотрицательных бактерий. На втором этапе применяют тесты минимального дифференцирующего ряда в наборе, необходимом для установления рода (дифференциации от сходных родов), а также вида у тех родов энтеробактерий, которые представлены единственным видом. Третий этап идентификации предполагает использование дополнительных биохимических тестов для внутривидовой дифференциации – определение видов, внутривидовую дифференциацию, а при необходимости и наличии соответствующих коммерческих диагностических сывороток и серологическую внутривидовую дифференциацию [3].

Комбинированные среды – Олькеницкого или Клиглера – используются для дальнейшего изучения выделенной чистой культуры и одновременного выявления ряда признаков, важных для определения семейства, рода или некоторых видов энтеробактерий по способности образовывать сероводород и отношению к глюкозе, лактозе (а также сахарозе и мочеvine – на среде Олькеницкого). Посев материала из колонии на комбинированную среду проводят бактериологической петлей вначале по скошенной части штрихом и заканчивают уколom в толщу агарового столбика, не достигая дна пробирки. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18–20 ч, а при целенаправленных исследованиях на иерсинии – в течение того же времени, но при 22–25°C.

О ферментации лактозы (и сахарозы) в среде Олькеницкого и ферментации лактозы в среде Клиглера судят по появлению желтой окраски в скошенной части агара, а о ферментации глюкозы – в столбике. Газообразование устанавливают по появлению пузырьков, разрывам агара, образованию сероводорода – по почернению среды обычно в средней части столбика, при значительной продукции можно наблюдать почернение всей среды. В среде Олькеницкого при росте культуры, гидролизующей мочеvinу,

происходит подщелачивание, вследствие чего среда приобретает диффузный яркий красно-малиновый цвет. В этом случае учет ферментации углеводов невозможен. При интенсивном образовании сероводорода, когда чернеет целиком вся среда, учет ферментации углеводов в средах Клиглера и Олькеницкого затруднен. Однако образование сероводорода может происходить лишь в кислой среде, которая создается за счет ферментации глюкозы, присущей всем энтеробактериям. Используя среду Клиглера, можно ориентировочно определить у исследуемой культуры способность к индолообразованию с помощью индикаторной полоски.

Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной является модифицированным аналогом среды Олькеницкого и предназначен для первичной идентификации энтеробактерий по их способности утилизировать мочеvinу, ферментировать лактозу, глюкозу, образовывать газ и сероводород. В составе среды отсутствует сахароза, так как уразоположительные и сахарозоположительные культуры могут давать на подобных средах с сахарозой ложную реакцию на определение утилизации мочевины. На рисунке 3 представлен рост тест-штаммов на железо-глюкозо-лактозном агаре с мочевиной с соответствующими биохимическими характеристиками.

По совокупности биохимических свойств, выявленных на комбинированных средах, делают предположительное заключение о возможной родовой принадлежности культуры. Для установления родовой принадлежности изучаемой культуры следует провести дифференциацию родов, т.е. использовать соответствующие тесты из минимального дифференцирующего ряда. Конкретный набор тестов определяют с учетом родов, подлежащих дифференциации. При затруднениях в дифференциации прибегают к определению дополнительных признаков у изучаемой культуры, используя данные о биохимических характеристиках родовых групп семейства *Enterobacteriaceae*.

Тест на образование индола (тест на триптофаназу) основан на том, что в процессе размножения микроорганизмов содержащийся в питательной среде триптофан расщепляется с образованием индола. Индолообразование определяют путем добавления реактивов Эрлиха или Ковача к культуре, выращенной в безуглеродной среде – пептонной воде (1–2%), бульоне Хоттингера, бульоне на триптическом переваре казеина.

Безусловным является тот факт, что наиболее интересна и востребована питательная среда, состав которой в совокупности с условиями культивирования определяет множественность выполняемых ею функций. Так, ГРМ-бульон предназначен для культивирования различных микроорганизмов, неприхотливых по своим питательным потребностям, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки. Помимо своих питательных особенностей, ГРМ-бульон обеспечивает образование сероводорода тест-штаммом *Salmonella typhi* H-901 ГДР/ГИСК и индола – тест-штаммом *S. flexneri* 1a 8516. При положительной реакции на индол бумажки, пропитанные модифицированным реактивом Эрлиха (пара-диметиламинобензальдегид – 4 г; спирт этиловый – 50 мл; кислота ортофосфорная – 10 мл), окрашиваются в розовый цвет (рис. 4а).

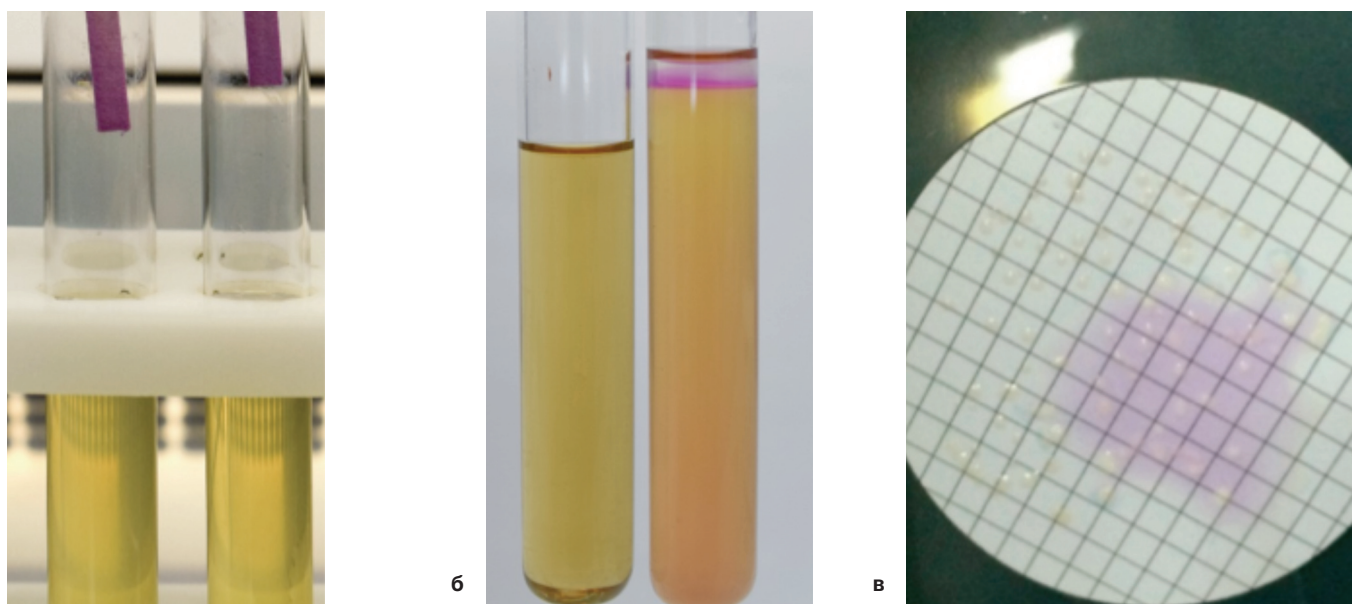


Рис. 4. Тестирование на индол. а – рост тест-штамма *S. flexneri* 1a 8516 на ГРМ-бульоне; б – рост *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде № 15 ГРМ; в – рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на ТЖА.

Классическим методом бактериологии является идентификация микроорганизма в виде чистой культуры. Примером питательной среды для дифференциации выделенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* по их способности к образованию индола является питательная среда № 15 ГРМ. При росте *E. coli* ATCC 25922 образуется индол, который определяется по появлению окрашивания от розового до ярко-красного после внесения в пробирки с культурами реактива Ковача или Эрлиха (рис. 4б).

К числу новых сред, предназначенных для проведения бактериологических исследований клинического и другого материала с целью получения дополнительной информации о состоянии и клинической ситуации при диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями, относится триптон-желчный агар. Принцип действия основан на определении способности энтеробактерий расти в присутствии больших концентраций желчи (желчных кислот). Кроме того, на среде также проводят тестирование на индол. Выросшие при температуре инкубации 43°C колиформные бактерии образуют красные колонии при окрашивании реактивом на индол (реактив Ковача) (рис. 4с). Рост других тест-штаммов, не относимых к эшерихиям, но продуцирующих индол, при температуре инкубации 43°C отсутствует, поскольку при повышенной температуре инкубации в присутствии желчных солей рост этих тест-штаммов подавляется, что значительно облегчает работу по выявлению эшерихий.

Для определения декарбоксилаз энтеробактерий используют жидкие и полужидкие питательные среды, содержащие лизин и индикаторы (бромкрезоловый пурпурный, бромтимоловый синий).

При положительном результате (утилизация лизина) определяются биохимические характеристики в виде диффузного помутнения среды с изменением цвета среды с зеленого на синий. На рисунке 5 представлена питательная среда для определения лизиндекарбоксилазы, содержащая

в своем составе индикатор бромтимоловый синий. Культуры микроорганизмов, не продуцирующие фермент декарбоксилазу и утилизирующие глюкозу, растут в виде диффузного помутнения среды с изменением цвета среды с зеленого на желтый. Питательная среда может использоваться и для дифференциации *S. Typhi* от *S. Paratyphi* A, поскольку отличительной особенностью *S. Paratyphi* A является неспособность декарбоксировать лизин.

Идентификация видов и внутривидовая дифференциация энтеробактерий составляет заключительный этап бактериологического исследования различных материалов. В большинстве случаев идентификация видов энтеробактерий предусматривает применение дополнительных к использованному на предыдущем этапе (определения рода)



Рис. 5. Слева направо. Рост тест-штаммов: *Klebsiella pneumoniae* 418, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* 65, *S. sonnei* «S form», *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* A-225, контроль (незасеянная среда с лизином).

биохимических тестов из минимального дифференцирующего ряда. Для обнаружения сахаролитических ферментов выделенной культуры используют ассортимент питательных сред Гисса. Изменения реакции среды, наступающие в результате деятельности ферментных систем микробов, выражаются в изменении цвета среды после 24 ч культивирования посевов. Отрицательная реакция при росте микроорганизмов не сопровождается изменением цвета среды и газообразованием.

В связи с общностью некоторых биохимических (ферментативных) и культуральных свойств целесообразно выделять основные признаки, по совокупности которых можно четко дифференцировать представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Для корректной внутриродовой и внутривидовой дифференциации энтеробактерий важно использовать комплекс тестов, позволяющих повысить специфичность метода за счет расширения диапазона определяемых биохимических свойств.

Заключение

При выделении энтеробактерий в практической деятельности некоторых микробиологических лабораторий используют классические слабоселективные питательные среды, такие как Эндо, Плоскирева, Левина и некоторые другие, при использовании которых дифференциация может быть осложнена ростом сопутствующей микрофлоры (роящиеся формы протеев, псевдомонады).

В последнее время появилась тенденция к использованию новых питательных сред, позволяющих идентифицировать широкий спектр энтеробактерий, принадлежащих к разным родам. Использование таких сред позволяет оценить спектр патогенов в пробе и их относительное количество.

Сравнительная оценка качества высокоселективных и многокомпонентных питательных сред: XLD-агара, лактозного ТТХ агара с тергитолом 7, по биологическим показателям показала преимущество по сравнению с традиционными средами по дифференцирующим свойствам, так как эти среды позволяют одновременно выделять и дифференцировать сальмонеллы, шигеллы и эшерихии в один этап. Кроме того, высокие интенсивность, яркость и специфичность цветов искомых колоний на таких средах существенно упрощают подсчет микроорганизмов.

При использовании комбинированных сред, таких как железо-глюкозолактозный агар с мочевиной, возможен учет нескольких признаков, характеризующих выделенную культуру, что позволяет значительно сузить диапазон подозреваемых родовых групп.

Сравнительная оценка питательных сред, используемых для определения индола, на индол-положительных тест-штаммах показала полное соответствие назначению каждой из этих питательных сред и преимущество ТЖА, использование которого позволяет не только визуально определить наличие в исследуемом образце термотолерантных колиформных бактерий, но и одновременно проводить тест на индол.

Применение современных питательных сред дает возможность определения не только внутриродовой дифференциации энтеробактерий, но и внутривидовой.

Правильный выбор среди разнообразия питательных сред будет способствовать повышению объективности получаемых результатов, а в отдельных случаях может стать определяющим фактором в принятии решения при микробиологической диагностике.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II. Под редакцией Лабинской АС, Костюковой НН, Ивановой СМ. М.: Изд. Бином, 2012, с. 994–995.
2. Химия и химическая технология. Справочник химика 21. Доступно по: <https://www.ru-ecology.info/info/104811>
3. МУ 04-723/3 Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями.
4. ГОСТ ISO 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред. М.: Стандартинформ; 2016, 90 с.
5. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография под ред. д.м.н., профессора А.Ю.Поповой и академика РАН И.А.Дятлова. 2020, с. 368–77.
6. Шепелин, АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. М.: Изд. Династия; 2017, 231 с.
7. Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Мартовецкий МН, Храмов МВ. Разработка и использование новой питательной среды для выявления и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008;6:70–2.
8. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажармачева НИ, Ершова МГ, Полетаева ЕД. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(9): 557–63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Volume 2, Dordrecht: Springer-Verlag New York Inc., 2006, P. 587–848.

References

1. Medical Microbiology. Private medical microbiology and etiological diagnostics of infections. Book II. Edited by Labinskaya AS, Kostyukova NN, Ivanova SM. Moscow: "Binom" Publ., 2012, pp. 994–995. (In Russian).
2. Chemistry and chemical technology. Available at: <https://www.ru-ecology.info/info/104811> (In Russian).
3. MU 04-723/3 Guidelines for the microbiological diagnosis of diseases caused by enterobacteria. (In Russian).
4. GOST ISO 11133-2016 Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and determination of working characteristics of nutrient media. Moscow: "Standartinform" Publ., 2016, 90 p. (In Russian).
5. Microbiological quality control of food products. Edited by A.Yu.Popova, I.A.Dyatlov. 2020, pp. 368–77. (In Russian).

6. Shepelin, AP, Dyatlov IA. Nutrient media for enterobacteria. Moscow: "Dinastiya" Publ., 2017, 231 p. (In Russian).
7. Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Martovetsky MN, Khranov MV. Development and use of a new growth medium for detection and identification of sanitary-indicative microorganisms. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2008;6:70-2. (In Russian).
8. Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Azhermacheva NI, Ershova MG, Poletaeva ED. Clinical trials of salmonella enrichment medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Volume 2, Dordrecht: Springer-Verlag New York Inc., 2006, P. 587-848.

Информация об авторе:

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

Information about author:

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

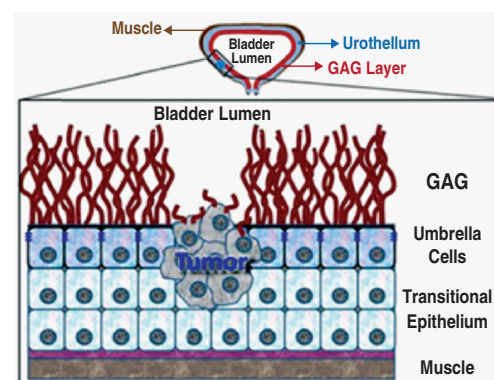
НОВОСТИ НАУКИ

Использование сибирской язвы для борьбы с раком

Ученые недавно опробовали метод, который использует сибирскую язву для борьбы с раком мочевого пузыря. Подход был успешным в экспериментах с использованием тканей человека и животных. Они надеются, что в будущем это может помочь в лечении ряда раковых заболеваний.

По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), в Соединенных Штатах ежегодно рак мочевого пузыря развивается у 74 000 человек, и около 17 000 умирают от этой болезни. Кроме того, рак мочевого пузыря часто развивается повторно после его удаления. Стандартные методы лечения рака мочевого пузыря инвазивны и требуют много времени. Лицо, проходящее курс лечения, должно сидеть не менее 2 часов с мочевым пузырем, полным противораковых средств. Для этой процедуры врачи чаще всего используют препараты митомицин С и Bacillus Calmette – Guérin (BCG). Побочные эффекты лечения включают мочевые симптомы, лихорадку, воспалительную реакцию и цистит. Кроме того, BCG в настоящее время в дефиците.

Разработка более эффективных подходов против рака мочевого пузыря является приоритетной задачей. Соответственно, эта работа обеспечивает основу для стратегии противоопухолевой трансформации, которая использует уникальные характеристики мочевого пузыря. В отличие от нормальных клеток мочевого пузыря, экранированных муцином, раковые клетки подвергаются воздействию просвета мочевого пузыря и чрезмерно экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). EGF-конъюгированный токсин сибирской язвы, который после достижения EGFR был усваивался и вызвал апоптоз в открытых клетках рака мочевого пузыря. В отличие от известных агентов, этот конъюгат EGF-токсин способствовал собственному поглощению посредством микрокластеризации рецепторов даже в присутствии Her2 и вызывал гибель клеток с LC50 <1 nM. Воздействия в течение 3 минут было достаточно, чтобы вызвать апоптоз клеток рака человека (T24), мыши (MB49) и собаки (первичный) мочевого пузыря. Воздействие этого препарата на мышей и собак без опухолей не привело к токсичности. Кроме того, EGF-токсин был способен удалять клетки из образцов опухоли пациента. Важно отметить, что введение EGF-токсина собакам со спонтанным раком мочевого пузыря, которые не смогли или не имели права на другие виды лечения, привело в среднем к уменьшению опухоли на 30% после одного цикла лечения. Из-за его высокой эффективности *in vitro* и *in vivo*, быстрого действия (сокращающего время лечения с нескольких часов до минут) и безопасности предлагается, что этот конъюгат EGF-токсин сибирской язвы послужит основой для новых трансформирующих подходов против рака мочевого пузыря.



Jack S. et al.

A novel, safe, fast and efficient treatment for Her2-positive and negative bladder cancer utilizing an EGF-anthrax toxin chimera
Int J Cancer. 2020;146(2):449–460.

Стратегии редактирования и модификации геномов бактериальных вирусов

А.С.Щурова¹, В.А.Баннов², А.В.Попова^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация;

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

В последние десятилетия серьезной проблемой для систем здравоохранения разных стран мира является широкое распространение бактериальных возбудителей, устойчивых к различным антимикробным препаратам. Возможным подходом для решения данной проблемы является использование бактериофагов – вирусов, специфически взаимодействующих с бактериальными клетками, а также ферментов и белков, закодированных в их геномах. Развитие технологий геномного редактирования, в том числе и на основе систем CRISPR-Cas, обуславливает возможность создания генно-инженерных или рекомбинантных фаговых частиц с заданными свойствами, важными для дальнейшего практического применения. В данном обзоре мы рассматриваем вопросы, связанные с характеристикой бактериофагов как биологических объектов и как перспективных кандидатов для контроля распространения антибиотикорезистентных штаммов. Кроме того, мы обсуждаем современные подходы и стратегии для модификации геномов бактериофагов с помощью различных методов генной инженерии и молекулярной биологии для решения разнообразных практических и исследовательских задач.

Ключевые слова: бактериофаги, редактирование геномов, гомологичная рекомбинация, CRISPR-Cas

Для цитирования: Щурова А.С., Баннов В.А., Попова А.В. Стратегии редактирования и модификации геномов бактериальных вирусов. Бактериология. 2020; 5(1): 48–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-48-59

The strategy of editing and modification of the genomes of bacterial viruses

A.S.Schurova¹, V.A.Bannov², A.V.Popova^{1,2}

¹Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

In recent decades, a major problem for health systems around the world is the wide spread of bacterial pathogens that are resistant to various antimicrobial agents. A possible approach to solving this problem is the use of bacteriophages, viruses that specifically infect bacterial cells, as well as enzymes and proteins encoded in their genomes. The development of genomic editing technologies, including those based on CRISPR-Cas editing, makes it possible to create genetically engineered or recombinant phage particles with desired properties that are important for further practical application. In this review, we consider issues related to the characterization of bacteriophages as biological objects and as promising candidates for controlling the spread of antibiotic-resistant bacterial strains. We discuss modern approaches and strategies for modifying the phage genomes using various methods of genetic engineering and molecular biology to solve a variety of practical and research problems.

Keywords: bacteriophages, phage genome editing, CRISPR-Cas system

For citation: Schurova A.S., Bannov V.A., Popova A.V. The strategy of editing and modification of the genomes of bacterial viruses. Bacteriology. 2020; 5(1): 48–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-48-59

На сегодняшний день проблема стремительно увеличивается числа множественно устойчивых к антимикробным препаратам бактериальных штаммов настоятельно требует поиска новых способов контроля их распро-

странения. В особенности это касается возбудителей внутрибольничных инфекций, характеризующихся резистентностью к большинству доступных на сегодняшний день антибиотиков, устойчивостью к дезинфицирующим средствам

Для корреспонденции:

Попова Анастасия Владимировна, старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

E-mail: popova_nastya86@mail.ru

Статья поступила 29.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

For correspondence:

Anastasia V. Popova, senior researcher, the Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University) and State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

E-mail: popova_nastya86@mail.ru

The article was received 29.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

и антисептикам, толерантностью к детергентам, ультрафиолетовому облучению, высушиванию, способностью к образованию биопленок на различных биотических и абиотических поверхностях [1–3].

Разработка новых биологически активных молекул происходит недостаточно быстро в силу как научных, так и экономических причин. Химическая модификация существующих антибиотиков, действующих на уже известные мишени, не решает проблему полностью: со временем бактерии приобретают устойчивость и к модифицированным вариантам [4]. В то же время поиск новых перспективных мишеней для действия антибиотиков, а также разработка ингибиторов для новых мишеней по-прежнему остаются очень медленной и трудоемкой работой.

Возможным альтернативным подходом для решения проблемы распространения антибиотикоустойчивых штаммов является использование литических бактериофагов, а также ферментов и белков, закодированных в фаговых геномах. Кроме того, благодаря активному развитию методов геномной и геномной инженерии, в частности редактирования с использованием систем CRISPR/Cas, у разных исследовательских групп по всему миру возникает все больший интерес к созданию генно-инженерных фаговых частиц с определенными свойствами, важными, в том числе, и для последующего практического использования. С помощью различных генетических инструментов для решения как фундаментальных, так и практических задач в определенные участки геномов бактериофагов могут быть внесены мутации, фрагменты ДНК или конкретные гены, произведены замены или делеции [5, 6]. Бактериальные вирусы могут быть модифицированы с целью расширения спектра их антибактериального действия путем изменения/замены генов, кодирующих их рецептор-связывающие/распознающие белки, что открывает широкие перспективы для контроля антибиотикорезистентных микроорганизмов.

Общая характеристика бактериофагов как биологических объектов и перспективных кандидатов для практического использования

Бактериофаги (фаги) – это крупнейшая группа вирусов, инфицирующих бактерии. Фаги могут рассматриваться как облигатные паразиты на молекулярном уровне с отсутствием независимого метаболизма вне бактериальной клетки, использующие белки, ферменты и химические компоненты клеток-хозяев для своего воспроизведения. Бактериофаги являются наиболее распространенными и убиквитарными биологическими объектами биосферы нашей планеты, с популяцией, насчитывающей более чем 10^{31} фаговых частиц [7, 8], и могут быть обнаружены в любых образцах окружающей среды и живых организмах, где обитают инфицируемые ими бактерии [9, 10]. Считается, что образцы водной среды могут содержать до 10^4 – 10^8 вирусных частиц на миллилитр [11], а почвенные образцы – 10^9 на грамм почвы [12].

Бактериофаги были открыты в начале прошлого века британским микробиологом Фредериком Твортом (1915 г.) [13] и канадским сотрудником Института Пастера в Париже Феликсом д'Эрелем (1917 г.) [14], которые независимо друг от друга сообщили об обнаружении фильтруемых субстан-

ций, способных разрушать бактериальные культуры и образовывать на бактериальных газонах небольшие «стерильные пятна». Именно д'Эрель предложил назвать эти субстанции «бактериофагами» (лат. *bacteriophaga* – пожирающий бактерии).

Большинство охарактеризованных на сегодняшний день бактериофагов относятся к отряду *Caudovirales* – «хвостатых» фагов, основными структурными компонентами которых являются головка (капсид) и хвостовой отросток. На основании морфологии хвостового отростка и особенностей организации геномов представители порядка *Caudovirales* подразделяются Подкомитетом по таксономии вирусов бактерий и архей (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) на несколько семейств, включающих фаги с длинными сократимыми хвостовыми отростками (например, представители семейства *Myoviridae*), с длинными несократимыми хвостовыми отростками (представители семейства *Siphoviridae*), с короткими несократимыми хвостовыми отростками (*Podoviridae* и *Autographiviridae*), с длинными сократимыми хвостовыми отростками и сложно организованным аппаратом адсорбции, представленным несколькими выростами или хвостовыми шипами (*Ackermannviridae*) [15].

По конечному результату инфекции бактериальной клетки среди представителей отряда *Caudovirales* выделяют две группы: вирулентные (литические) и умеренные фаги. Жизненный цикл вирулентных фагов включает следующие основные этапы: 1) адсорбция фага на бактериальной клетке-хозяине за счет специфического взаимодействия рецептор-связывающих/распознающих фаговых белков с поверхностными структурами бактериальных клеток; 2) проникновение в клетку фаговой ДНК; 3) внутриклеточное развитие, включающее репликацию ДНК и синтез структурных компонентов, а также сборку фаговых частиц и 4) высвобождение новых частиц-потомков. В результате такой инфекции бактерия-хозяин погибает [16]. Поэтому именно вирулентные бактериофаги представляют наибольший интерес для контроля распространения бактериальных патогенов, в том числе и антибиотико-резистентных (рис. 1).

Умеренные бактериофаги способны воспроизводить себя путем такого же литического цикла, с помощью которого обеспечивается быстрое образование большого числа копий фаговых частиц, однако развитие этих фагов может пойти и по другому пути. В этом случае бактериофаг может интегрироваться в хромосому клетки-хозяина или присутствовать в клетке в свободном плазмидоподобном состоянии, реплицируясь и распределяясь по дочерним бактериальным клеткам в строгом соответствии с репликацией и делением бактерии [16, 17] (рис. 1).

Как антибактериальные агенты бактериофаги обладают рядом преимуществ: вследствие специфичности своего действия высоковирулентные фаги не влияют на нормальную микрофлору, соответственно, не вызывают развития дисбактериозных процессов; фаги способны экспоненциально реплицироваться в инфекционном очаге и увеличивать свою численность до тех пор, пока не будут уничтожены все чувствительные к ним бактериальные клетки; бактериофаги можно использовать наряду с другими антибактериальными агентами, в том числе для борьбы с множественно устойчивыми микроорганизмами [19–22].

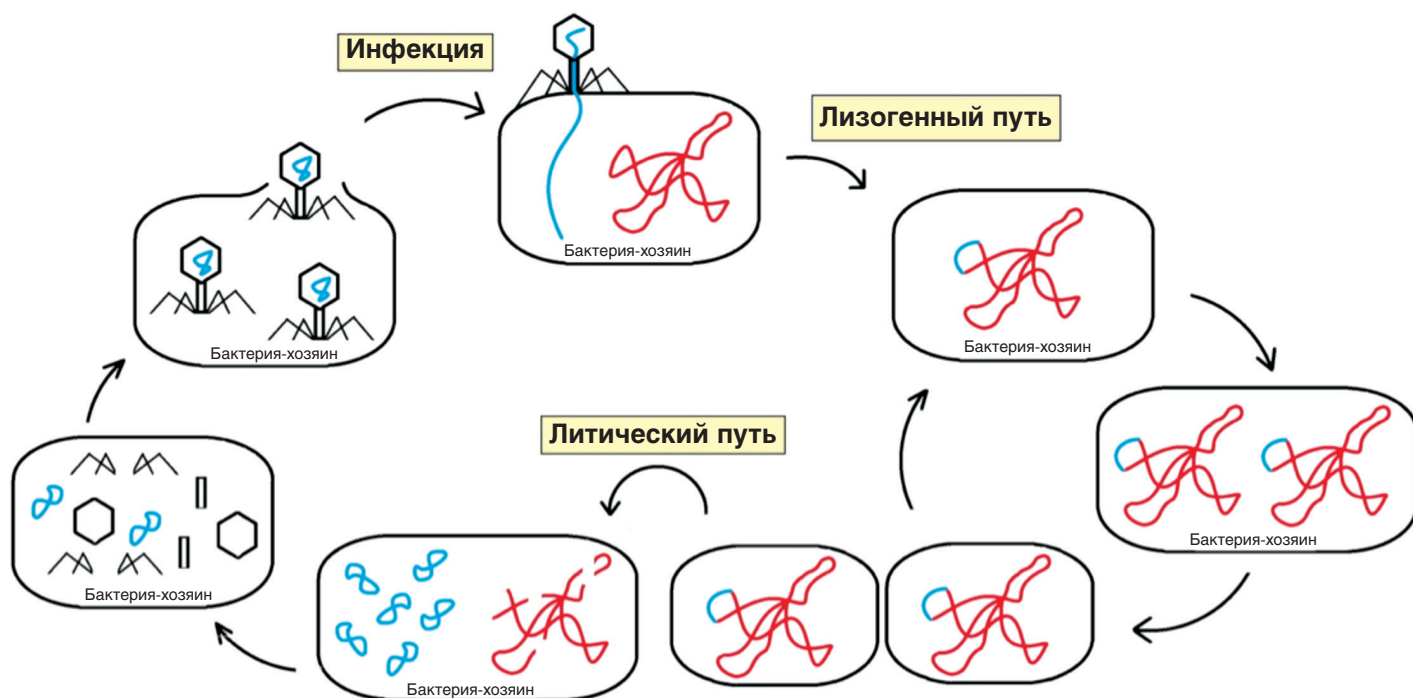


Рис. 1. Схематическое изображение жизненного цикла бактериофагов (Reyes A. et al. [18], с модификацией).

Для вирулентных бактериофагов характерно множество молекулярных механизмов, позволяющих им успешно и быстро инфицировать бактериальных хозяев, развиваться в них, подавляя или модифицируя жизненно важные клеточные процессы, что, в конечном итоге, приводит к гибели инфицированных бактерий. Особую роль в этом играют фаговые белки, экспрессируемые на ранних стадиях инфекции. Эти белки связываются с хозяйскими белками-компонентами функционально важных клеточных систем и быстро и эффективно ингибируют их или переориентируют метаболизм бактериальной клетки на выработку фагового потомства [23]. Кроме того, в геномах всех литических фагов закодированы эндолизины – пептидогликанлизирующие ферменты, эффективно и быстро разрушающие пептидогликановый слой клеточных стенок бактерий на поздней стадии инфекции. Нарботка эндолизинов запускается одновременно с синтезом и встраиванием в мембрану специальных регуляторных белков – холинов (мембрано-проникающих регуляторных белков лизиса), способствующих проникновению эндолизинов через плазматическую мембрану к пептидогликановому слою, что приводит к тотальному разрушению клетки и выходу фаговых частиц наружу [8, 23]. Также геномы многих бактериофагов содержат гены, кодирующие белки с полисахариддеполимеризующей активностью. Это высокоспецифичные деполимеразы (часто структурные белки, например выросты хвостовых отростков или хвостовые шипы бактериофагов), ответственные за расщепление капсульных полисахаридов и прикрепление к бактериальной клетке-хозяину [23, 24].

Таким образом, бактериофаги, а также ферменты и белки, закодированные в фаговых геномах, являются перспективными агентами для контроля распространения различных возбудителей бактериальных инфекций, в том числе множественно-устойчивых к различным антимикробным

препаратам. В связи с этим в последние десятилетия как в нашей стране, так и за рубежом возобновился интерес к использованию бактериофагов как антибактериальных агентов. Развитие фаготерапии в значительной степени обусловлено не только более глубоким пониманием биологии фагов, но также реально существующим прогрессом в молекулярной биологии, биотехнологии и биохимии. В России препараты бактериофагов официально разрешены и используются для лечения и профилактики острых кишечных инфекций – дизентерии, брюшного тифа и сальмонеллеза, а также для лечения гнойно-септических и интестинальных заболеваний различной локализации, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, относящимися к родам *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter* [25].

Однако, несмотря на очевидный интерес к фаготерапии во всем мире, остается круг нерешенных проблем, затрудняющих использование бактериофагов в качестве лекарственных антимикробных средств. В частности, это связано с отсутствием обширных коллекций строго вирулентных бактериофагов с определенным набором характеристик, важных для дальнейшего практического использования. Вследствие того, что фаги высокоспецифичны к определенным штаммам внутри конкретного вида бактерий, необходимо создание препаратов-коктейлей, состоящих из различных вирулентных фагов, инфицирующих актуальных для конкретного отделения/больницы/города/страны бактериальных возбудителей. Регистрация подобных препаратов для терапевтического применения может быть достаточно сложной задачей из-за значительного разнообразия фагов с точки зрения их структуры, жизненного цикла и организации их геномов [26, 27]. Кроме того, бактериальные клетки могут формировать устойчивость к инфицированию бактериофагами, что может быть обусловлено раз-

личными механизмами, в частности – утратой/модификацией поверхностных структур, с которыми взаимодействуют рецептор-распознающие/связывающие фаговые белки [27–29].

С помощью стремительно развивающихся методов геномной инженерии можно преодолеть некоторые из вышеперечисленных ограничений [30]. Основой для создания генно-инженерных фагов с заданными свойствами является постоянно растущее количество полногеномных последовательностей бактериофагов в общедоступных базах данных [31, 32], а также исследования, касающиеся изучения структурных компонентов фаговых частиц [33–37] и особенностей взаимодействия между фагами и их бактериальными хозяевами [38–40].

Методы редактирования и модификации геномов бактериофагов

Для редактирования геномов бактериофагов, в том числе с целью преодоления возможных ограничений их практического применения, используют различные подходы, которые будут подробно рассмотрены в данном разделе.

Гомологичная рекомбинация

Одним из широко распространенных методов модификации геномов является гомологичная рекомбинация в клетках бактериальных хозяев, которая может происходить между двумя гомологичными последовательностями ДНК, длиной не менее 23 п.н. (пар нуклеотидов) [41, 42]. Гомологичная рекомбинация является основным механизмом репарации ДНК бактерий, кроме того, путем гомологичной рекомбинации может происходить обмен попавшей внутрь клетки гетерологичной ДНК с их собственной ДНК при наличии гомологичных участков [43, 44]. Соответственно, механизм, лежащий в основе гомологичной рекомбинации, может быть использован для целенаправленного редактирования геномов бактериофагов, а именно вставок, замен, делеций (уда-

лений) фрагментов ДНК и конкретных генов, а также внесения мутаций в определенные участки генома.

Например, для вставки гетерологичного гена / фрагмента ДНК в геном конкретного фага необходимо, чтобы данный ген / фрагмент был фланкирован гомологичными участками, которые и определяют место его вставки в геном фага (рис. 2). При этом гетерологичный ген / фрагмент ДНК вводится в бактериальную клетку в составе плазмидного вектора (донорной плазмиды). Затем бактериальная клетка, несущая донорную плазмиду, инфицируется фагом, в геноме которого необходимо произвести модификацию. И далее между ДНК фага и донорной плазмидой (матрицей) происходит гомологичная рекомбинация, за счет чего гетерологичный ген / фрагмент ДНК встраивается в генетический материал фага, который затем упаковывается в новые фаговые частицы [5, 45]. Аналогичным образом подход, основанный на гомологичной рекомбинации между матрицей и фаговой ДНК, может быть использован для получения рекомбинантных фагов с заменами, делециями генов и мутациями в конкретном участке генома фага [5, 6].

После попадания фаговой ДНК внутрь бактериальной клетки, содержащей донорную плазмиду со вставкой гетерологичного участка (отмечен красным цветом) и плечами для рекомбинации (участками размером 40–200 п.н., которые гомологичны той части генома фага, где планируется вставка), происходит рекомбинация между плазмидой-матрицей и генетическим материалом фага, с последующим формированием рекомбинантных фаговых частиц.

В целом частота рекомбинации составляет от 10^{-10} до 5×10^{-3} [5, 6], поэтому для облегчения скрининга рекомбинантных фагов гетерологичный участок ДНК (для вставки, делеции, замены или внесения мутации) может быть ассоциирован с генами флуоресцентных белков (например, GFP) или люциферазы [46–48].

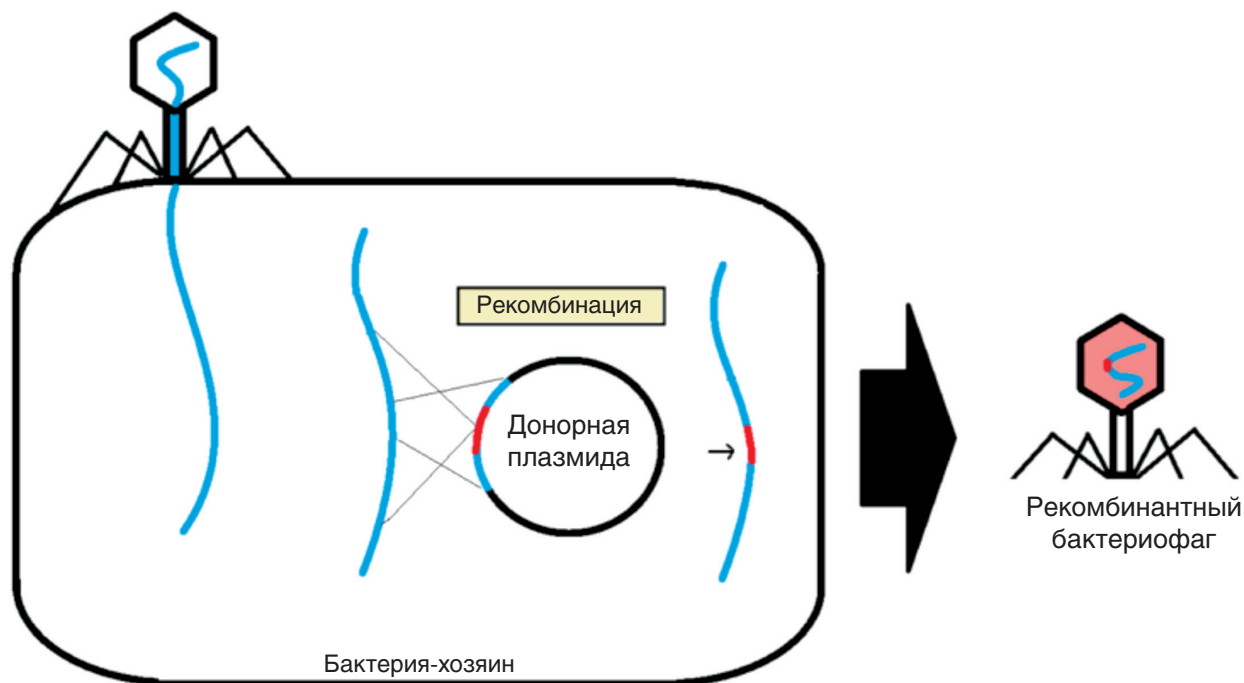


Рис. 2. Получение рекомбинантных фагов путем гомологичной рекомбинации.

Путем гомологичной рекомбинации был произведен обмен генов, кодирующих длинные хвостовые фибриллы (gp37 и gp38) фага T2, специфичного к штамму *Escherichia coli* K-12, на гены хвостовых фибрилл фага PP01, специфически инфицирующего *E. coli* O157:H7. При этом рекомбинантный бактериофаг T2ppD1 (несущий гены, кодирующие gp37 и gp38 фага PP01) приобрел способность инфицировать тот же круг бактериальных хозяев, что и фаг PP01, но утратил способность инфицировать *E. coli* K-12 [49]. Такой же подход использовался в работе Mahichi et al. для расширения спектра антибактериальной активности фага T2. Поскольку бактериофаг IP008 обладал более широким спектром антибактериальной активности по сравнению с фагом T2 (инфицировал 33% против 7% изолятов *E. coli* соответственно), путем гомологичной рекомбинации была произведена замена генов gp37 и gp38 фага T2 на соответствующие гены фага IP008, что привело к тому, что спектр антибактериальной активности модифицированного фага T2 стал аналогичным спектру фага IP008 [50].

Получение рекомбинантных фагов путем совместной электропорации фаговой ДНК и матрицы для рекомбинации

Впервые этот методологический подход, основанный на рекомбинации между электропорированной внутрь бактериальной клетки фаговой ДНК и матрицей для рекомбинации (bacteriophage recombineering of electroporated DNA, BRED) был использован Marinelli et al. для модификации микобактериофагов [51, 52], а позже был применен для фагов, инфицирующих *E. coli* и *Salmonella enterica* [53, 54]. В целом BRED может быть использован для делеции, вставки или замены генов, а также внесения точечных мутаций в геном бактериофага. Суть метода заключается в совместной электропорации ДНК бактериофага и двухцепочечной ДНК(дцДНК)-матрицы в электрокомпетентные бактериальные клетки, несущие плазмиды с генами белков, обеспечивающих высокий уровень гомологичной рекомбинации, таких как белки Red-системы фага лямбда или RecE/RecT-подобные белки [51, 52] (рис. 3). Red-система – это хорошо изученная система рекомбинации фагов, состоящая из генов *gam* (γ), *exo* (α) и *bet* (β). Gam ингибирует экзонуклеазный комплекс RecBCD *E. coli* для предотвращения разрушения линейной дцДНК-матрицы [55]. Exo взаимодействует с концами дцДНК-матрицы и обеспечивает деградацию одной из ее цепей в направлении 5'-3', в результате чего формируется одноцепочечная ДНК(оцДНК)-матрица. Beta связывает оцДНК-матрицу с участком фагового генома, в котором будет происходить рекомбинация. дцДНК-матрица для рекомбинации, которую электропорировают вместе с ДНК фага, включает необходимый для модификации фрагмент ДНК (дополнительная вставка или фрагмент с делецией/мутацией) и гомологичные участки к локусам выше и ниже участка генома фага, в который необходимо внести изменения [52, 56]. Электропорированные таким образом бактериальные клетки смешивают с клетками дикого типа и высевают на плотные питательные среды в чашках Петри. После этого фаговые бляшки (негативные колонии), формируемые на бактериальных газонах, проверяются методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие необходимой модификации в геноме фагов [52]. Отмечено, что при использовании данной методологии на выходе удастся получить 10–15% рекомбинантных фаговых частиц, что значительно упрощает скрининг и отбор фагов с необходимой модификацией в геноме, однако для проведения подобных экспериментов необходимо использовать исключительно высококомпетентные бактериальные клетки [5].

Очищенная фаговая ДНК и двухцепочечная ДНК-матрица совместно электропорировываются в бактериальную клетку, с последующей рекомбинацией между их гомологичными областями (отмечены желтым цветом).

Сборка фаговой ДНК *in vitro* и *in vivo*

Рекомбинантные бактериофаги могут быть получены и при трансформации бактериальной клетки геномной ДНК фага, содержащей желаемые мутации, вследствие ее репликации, транскрипции и трансляции и последующего формирования структурных компонентов и сборки новых фаговых частиц [6] (рис. 4).

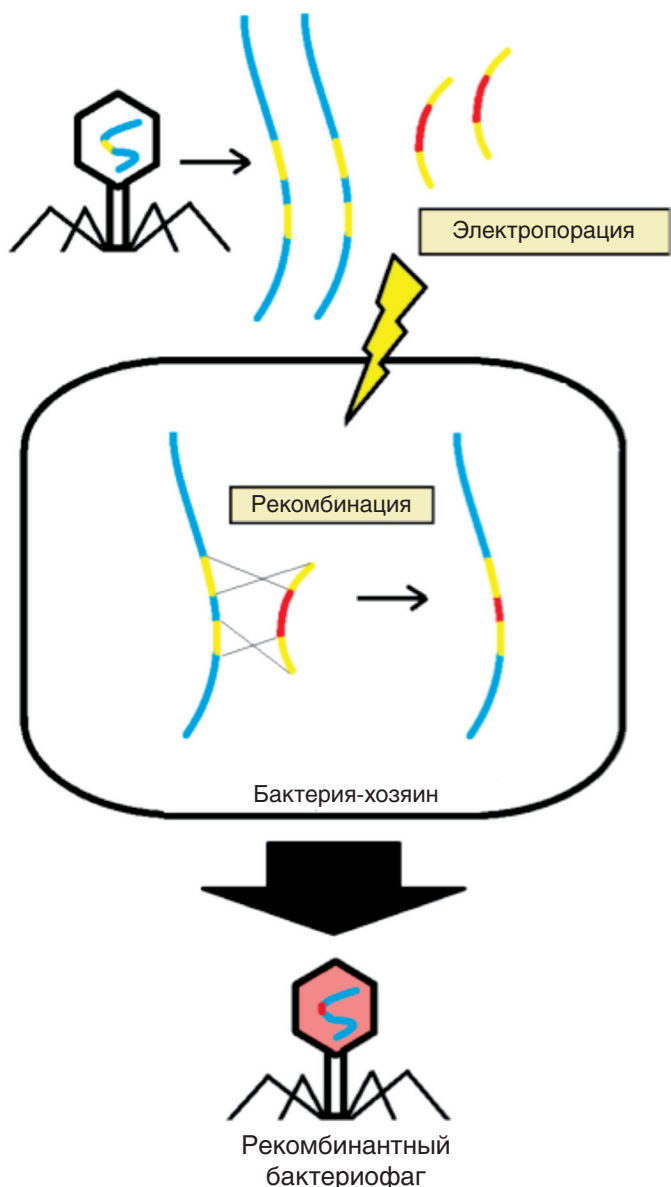


Рис. 3. Получение рекомбинантных фагов путем BRED.

При этом для фагов с небольшими геномами, таких как phiX174 (5386 п.н.), геномная ДНК может быть собрана *in vitro* с помощью полимеразной циклической сборки (polymerase cycle assembly, PCA) с использованием перекрывающихся синтетических оцДНК – олигонуклеотидов, покрывающих весь геном [57, 58]. Для фагов с геномами большего размера, таких как T7 (39937 п.н.), геномная ДНК может быть собрана *in vitro* путем лигирования отдельных фрагментов, образованных при обработке фаговой ДНК эндонуклеазами рестрикции [59].

Сборку и редактирование фаговых геномов также осуществляют с помощью трансформационно-ассоциированной рекомбинации (transformation-associated recombination, TAR) при участии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выступающих в качестве промежуточных хозяев для генетических манипуляций. Данный подход основан на том, что участки генома бактериофага амплифицируются с помощью ПЦР таким образом, чтобы соседние фрагменты содержали перекрывающиеся гомологичные последовательности, а первый и последний фрагменты генома фага содержали

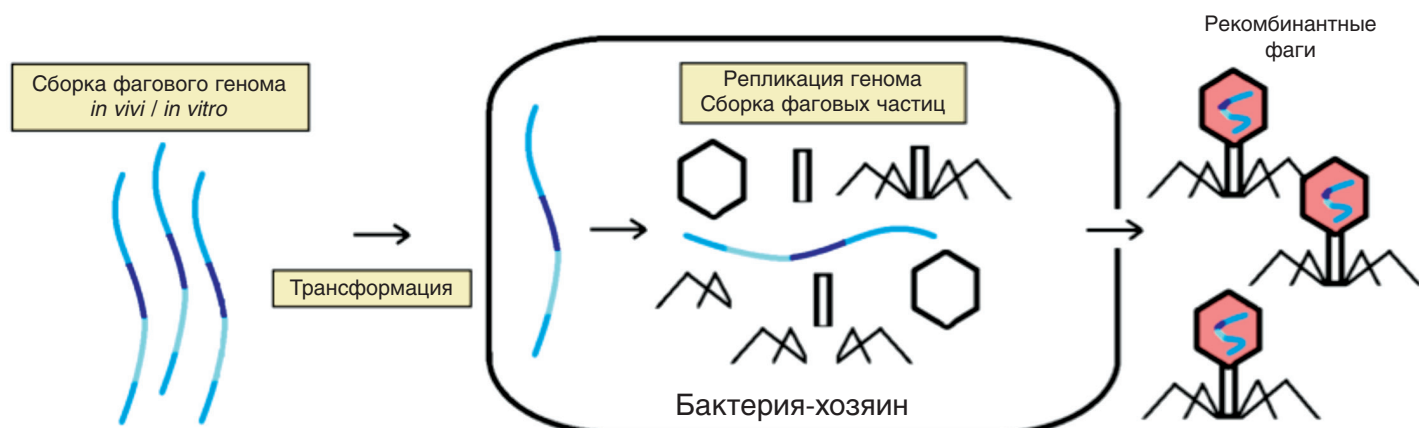


Рис. 4. Получение рекомбинантных фагов после сборки генома *in vitro* / *in vivo*. Модифицированная ДНК фага, несущая желаемые мутации/вставки/делеции/замены, трансформируется в бактерию-хозяина с последующей сборкой рекомбинантных фаговых частиц.

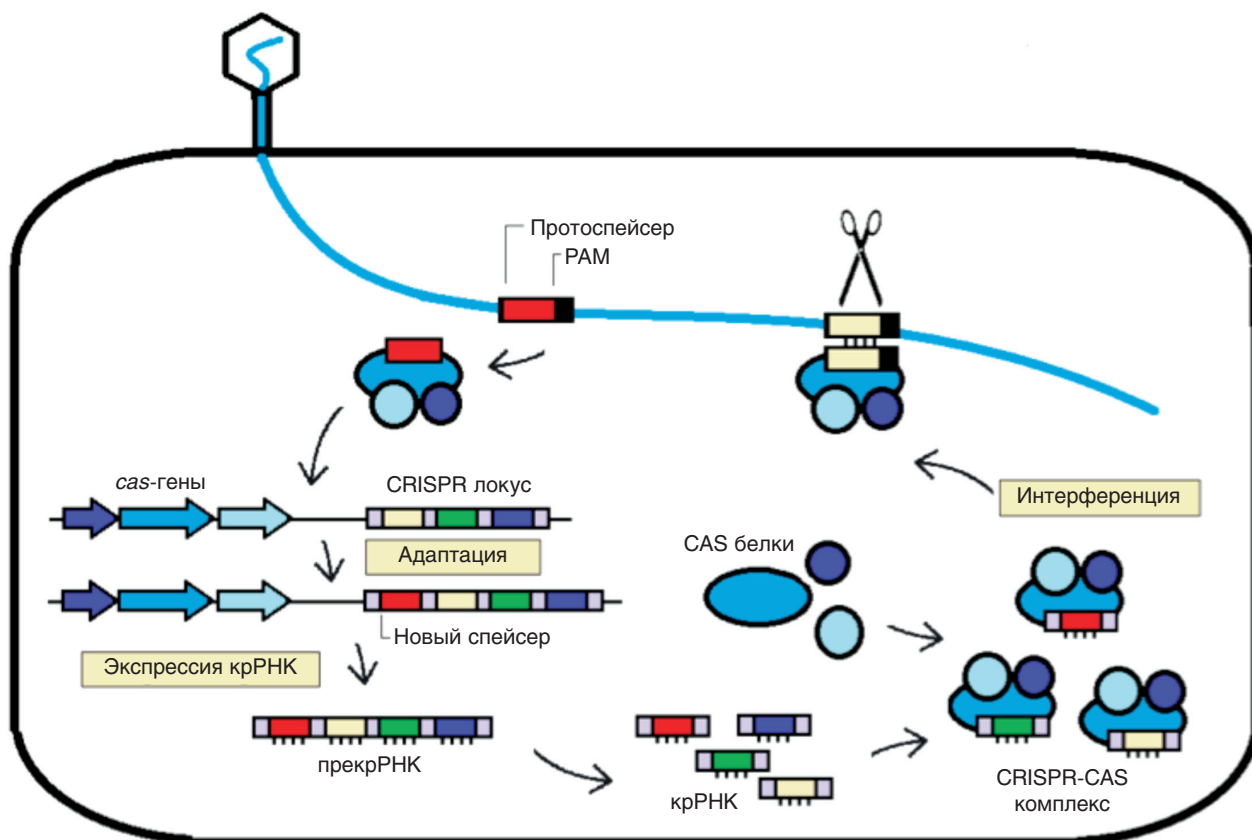


Рис. 5. Три основных этапа функционирования CRISPR-Cas систем (Samson JE et al. [29], с модификацией): адаптация (добавление новых спейсеров в CRISPR-кассету), экспрессия крПНК (транскрипция CRISPR-локуса в длинный первичный транскрипт прекрПНК – основу для формирования коротких крПНК) и интерференция (деградация чужеродной ДНК или РНК, комплементарной крПНК, за счет комплекса CRISPR-Cas).

участки, гомологичные последовательностям векторов, способных реплицироваться в дрожжах. При трансформации в дрожжевые клетки данные фрагменты объединяются в полную нуклеотидную последовательность фагового генома в составе дрожжевого вектора. Затем ДНК извлекается из дрожжей и трансформируется в бактериальные клетки-хозяева с целью образования новых рекомбинантных фаговых частиц. Таким способом может быть модифицирован любой участок генома (например, введена точечная мутация или произведены обмен/вставка нуклеотидной последовательности) [60, 61]. В частности, такой подход был использован в работе Ando et al. для модификации геномов фагов *E. coli* T3 и T7 и клебсиеллезного фага K11, в которой были представлены результаты по обмену между данными фагами генов, кодирующих хвостовые фибриллы и их компоненты, с получением пула рекомбинантных фагов с измененным кругом бактериальных хозяев [61]. В целом метод трансформационно-ассоциированной рекомбинации подходит для сборки геномов размером до 300000 п.н. [62, 63].

Редактирование геномов при помощи систем CRISPR-Cas

Применение методологии, основанной на использовании систем CRISPR-Cas, является новым и стремительно развивающимся направлением геномной инженерии.

Еще в 1987 г. было обнаружено, что геномы *E. coli* содержат необычные короткие (30–40 п.н.) палиндромные повторяющиеся последовательности равной длины, разделенные участками уникальной ДНК – спейсерами (20–80 п.н.) [64]. Позднее было обнаружено, что аналогичные структуры встречаются в геномах 95% архей и 60% бактерий [65]. Такие группы повторов получили название CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). У прокариот CRISPR являются компонентом адаптивной «иммунной системы», которая обеспечивает защиту от

проникновения чужеродного генетического материала вирусов и плазмид.

CRISPR-система состоит из двух компонентов: CRISPR-кассет и Cas-белков (CRISPR-associated proteins) [29]. Каждая функциональная кассета содержит элементы трех типов: АТ-богатую лидерную последовательность, которая задает направление транскрипции кассеты, уникальные спейсеры, гомологичные последовательностям чужеродных ДНК (протоспейсерам), и повторы, концы которых при транскрипции могут комплементарно взаимодействовать между собой с образованием устойчивых вторичных структур – различных шпильек. Шпильки необходимы для взаимодействия с Cas-белками, обеспечивающими функционирование CRISPR-систем, в том числе и гидролиз целевой ДНК за счет своей эндонуклеазной активности [66]. Гены, кодирующие данные белки (cas-гены), локализованы в непосредственной близости от большинства CRISPR-кассет.

Система предоставляет собой защиту против вирусной ДНК [67] и РНК [68] через трехстадийный процесс, включающий в себя следующие этапы: адаптация – добавление новых спейсеров в CRISPR-кассету; экспрессия криспрРНК (крПНК, от англ. crisprRNA) – транскрипция прекрПНК с последующим процессингом коротких крПНК, нацеленных на определенную мишень, и интерференция – распознавание и деградация чужеродной ДНК или РНК (рис. 5) [29].

CRISPR-адаптация является одним из немногих механизмов направленного изменения генома в клетке: протоспейсер чужеродной ДНК встраивается в CRISPR-кассету и становится новым спейсером, при одновременной дупликации CRISPR-повтора. В большинстве случаев протоспейсеры расположены рядом с короткими мотивами длиной 2–3 нуклеотида, так называемыми PAM-последовательностями (Protospacer Adjacent Motif) [69]. PAM-мотивы могут служить

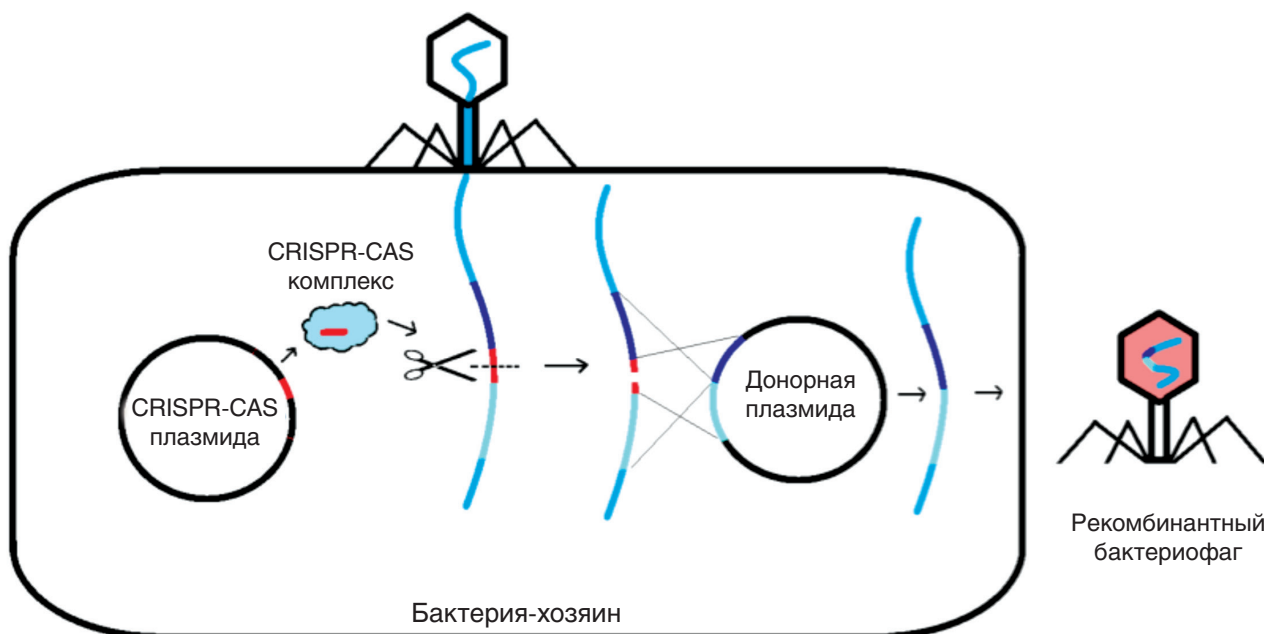


Рис. 6. Схема эксперимента по редактированию генома бактериофага (делеция гена) с помощью системы CRISPR-Cas. После проникновения фаговой ДНК в клетку CRISPR-Cas-комплекс (нуклеаза, направляемая sgРНК) осуществляет разрез в дцДНК (в том месте, где находится последовательность, комплементарная sgРНК), который впоследствии устраняется при помощи гомологичной рекомбинации с донорной плазмидой.

маркерами, позволяющими CRISPR-системе бактерий отличить собственную ДНК от чужеродной [70].

На сегодняшний день на основании различного набора генов *cas* и способа генерации кРНК системы CRISPR-Cas разделяют на 2 класса, 6 типов и 33 подтипа [71]. Для редактирования геномов преимущественно используются системы CRISPR-Cas класса 2 типа II вследствие относительной

простоты организации эффекторного комплекса. В таких системах внесение двуцепочечных разрывов обеспечивается всего одним белком – Cas9 – в том определенном участке генома (протоспейсере), который комплементарен спейсерной последовательности, присутствующей в кРНК [71].

Система CRISPR-Cas широко используется в экспериментах для модификации геномов эукариотических и прокарио-

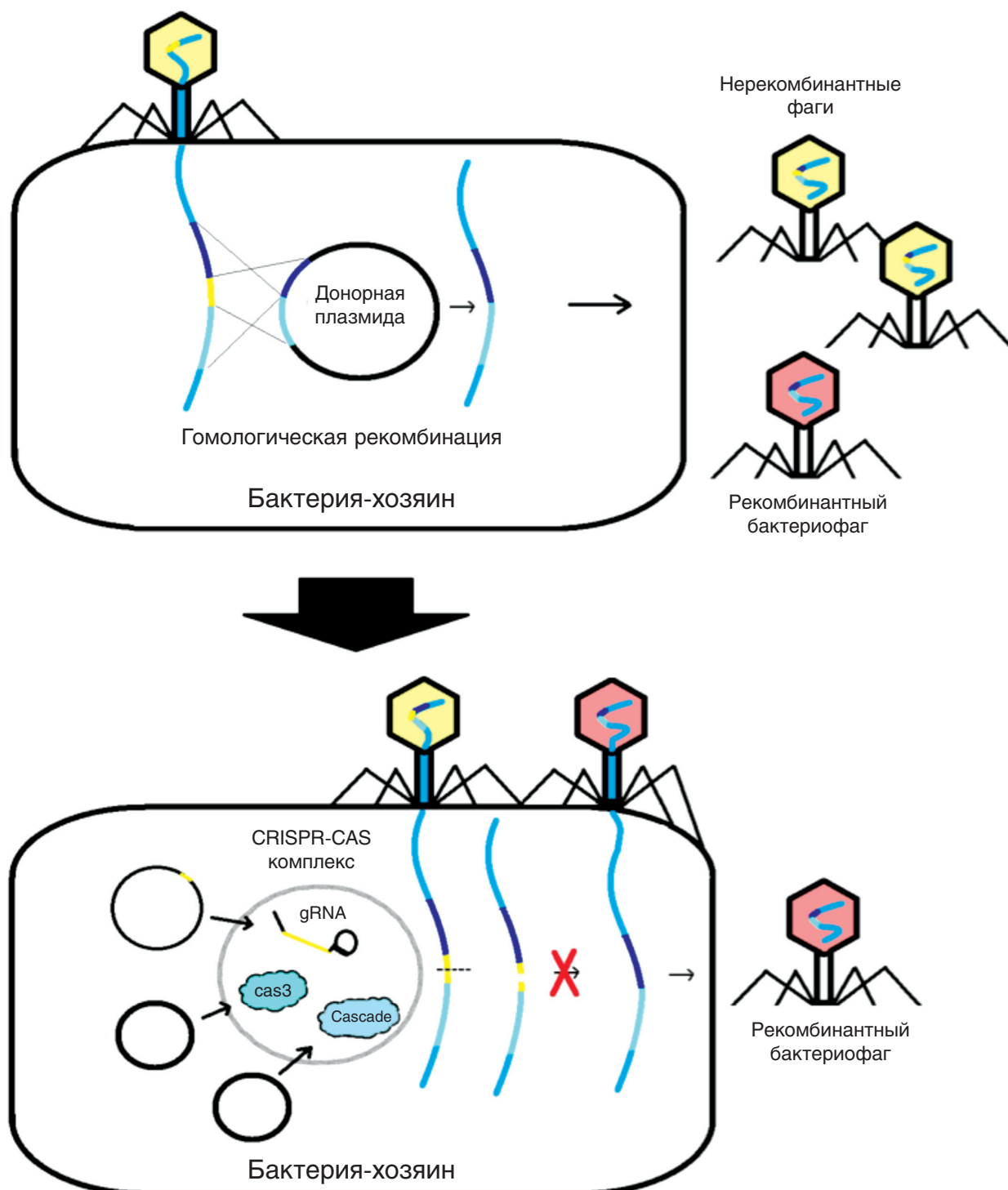


Рис. 7. Редактирование геномов бактериофагов (делеция) и отбор рекомбинантных фаговых частиц с помощью системы CRISPR-Cas I-E. После инфицирования фагом бактериальных клеток-хозяев, несущих донорные плазмиды-матрицы, происходит гомологичная рекомбинация с генетическим материалом фага. После лизиса бактериальных клеток высвобождается фаговое потомство, часть из которого представлена фагами дикого типа, а часть – рекомбинантными фагами. Для дальнейшей селекции рекомбинантных фагов полученной смесью заражают бактериальные клетки, содержащие плазмиды с компонентами комплекса CRISPR-Cas, нацеленного на область в геноме, присутствующую только у фагов дикого типа, в результате чего происходит их элиминация.

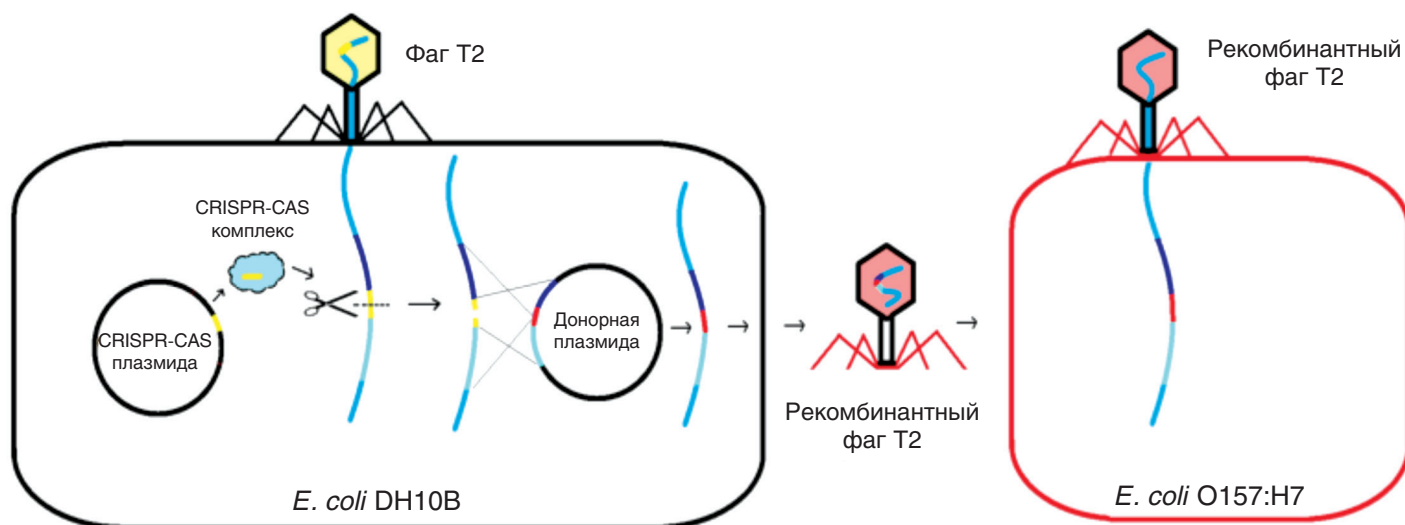


Рис. 8. Модификация генома фага T2 путем замены генов хвостовых фибрилл с помощью системы CRISPR-Cas9. При инфицировании фагом T2 штамма *E. coli* DH10B, несущего плазмиду с генами хвостовых фибрилл фага PP01, а также плазмиду с компонентами комплекса CRISPR-Cas9, в результате гомологичной рекомбинации образуются фаговые частицы, способные инфицировать штамм *E. coli* O157:H7 (штамм-хозяин фага PP01).

тических организмов. Тем не менее в настоящий момент опубликовано сравнительно мало работ, посвященных редактированию геномов бактериофагов. Ограничениями использования систем CRISPR-Cas для модификации геномов фагов могут являться различные анти-CRISPR-механизмы, обнаруженные у фагов, короткий литический цикл бактериофагов или модификация фаговой ДНК. Однако несомненным преимуществом является то, что с помощью CRISPR-Cas-систем можно вносить целенаправленные изменения в геном бактериофага в процессе заражения бактериальной клетки: точечные мутации, делеции, вставки новых генов и замены, а также осуществлять эффективный отбор рекомбинантных клонов [5, 6].

Для редактирования генома бактериофага с использованием систем CRISPR-Cas бактериальную клетку-хозяина трансформируют одной или несколькими плазмидами, содержащими гены, кодирующие: 1) эффекторный белок системы CRISPR-Cas (например, нуклеаза Cas9); 2) одиночную направляющую или гидовую РНК (sgRNA), которая связывает комплементарный ей участок целевой ДНК длиной 20 нуклеотидов (протоспейсер), обеспечивая направленную доставку нуклеазы к мотиву, прилегающему к протоспейсеру (сайт PAM, NGG, где N – любой нуклеотид), взаимодействие которого с нуклеазой приводит к эффективному разрезанию целевой последовательности ДНК. Кроме того, в бактериальную клетку электропорируют донорную плазмиду/матрицу, содержащую фрагмент ДНК со вставкой/делецией/мутацией/заменой для дальнейшей рекомбинации с фаговой ДНК внутри бактериальной клетки и последующей сборки рекомбинантных фаговых частиц (рис. 6).

Представленная на рис. 6 схема была использована для редактирования с помощью системы CRISPR-Cas9 (тип II-A) модифицированного (содержащего гликозилированный гидроксиметилцитозин) и немодифицированного генома фага T4, инфицирующего *E. coli*, а именно для внесения точечных мутаций, вставок и делеций в определенных областях генома [72]. В другой работе, используя данную схему,

была произведена делеция девяти разных генов (в том числе гена, кодирующего холин) и одного предполагаемого промотора вирулентного бактериофага *Klebsiella* phiKpS2 семейства *Podoviridae* [73].

В 2014 г. Kiro et al. опубликовали работу, в которой при помощи системы CRISPR-Cas тип I-E осуществили модификацию генома бактериофага T7 – делецию гена полинуклеотидкиназы 1.7 [74]. Кроме того, эта же система была использована для эффективного отбора рекомбинантных фагов: вновь образованные фаговые частицы добавляли к бактериальным клеткам, содержащим плазмиды, кодирующие компоненты системы CRISPR-Cas. В результате действия эффекторного комплекса, направляемого sgRNA, была проведена избирательная элиминация тех фагов, геномы которых содержали ген 1.7. При этом рекомбинантные фаги, в геномах которых отсутствовал ген полинуклеотидкиназы, оставались жизнеспособными (рис. 7).

В другой работе было показано, что система CRISPR-Cas тип I-E, идентифицированная у штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, сохраняет функциональную активность и у представителей биовара Эль Тор. Также с помощью данной системы была показана возможность эффективного редактирования геномов литических фагов, инфицирующих *V. cholerae* [75].

В работе Hupfeld M. et al. были охарактеризованы два CRISPR-локуса (LivCRISPR-1 и LivCRISPR-2), идентифицированных в геноме *Listeria ivanovii* [76]. Сконструированная на основе LivCRISPR-1 сиквенс-специфичная программируемая нуклеазная система позволила эффективно редактировать геномы вирулентных бактериофагов, инфицирующих представителей рода *Listeria*. В результате был получен генно-инженерный листериозный бактериофаг (модифицированный фаг A511), способный индуцировать продукцию и высвобождение гидролазы, разрушающей клеточную стенку представителей рода *Staphylococcus*. Это позволило элиминировать не только листерии, но и стафилококки при совместном культивировании бактерий. Как и в работах, опи-

санных выше, редактирование и отбор мутантных фагов производили в два этапа: размножение фага на бактериях, несущих плазмиду для гомологичной рекомбинации, и отбор рекомбинантных фагов на бактериях, несущих плазмиды, кодирующие комплекс CRISPR-Cas9.

В 2018 г. Тобиас Шиллинг и соавт. разработали приложение CutSPR (<https://github.com/sdietri/cutspr>) – биоинформатический инструмент, позволяющий осуществить дизайн праймеров и генетических конструкций на основе плазмидного вектора pJOE8999 для специфического мутагенеза с помощью систем CRISPR-Cas9 [77]. С помощью данного ресурса были получены генетические конструкции с компонентами системы CRISPR-Cas, которые использовали для делеции и вставки генов в геном фага vB_BsuP-Goe1, инфицирующего *Bacillus subtilis*.

В феврале 2019 г. была опубликована работа, посвященная редактированию генома фага T2 с использованием системы CRISPR-Cas9 с целью расширения/изменения спектра его антибактериальной активности путем замены генов, кодирующих как длинные, так и короткие хвостовые фибриллы, на соответствующие гены фага PP01, способного инфицировать *E. coli* O157:H7 [78]. В результате был получен рекомбинантный фаг T2, также способный инфицировать *E. coli* O157:H7 (рис. 8).

Заключение

Таким образом, бактериофаги и закодированные в их геномах белки и ферменты являются кандидатами для разработки антибактериальных средств, активных против различных бактериальных возбудителей. Изучение геномного и структурного разнообразия бактериальных вирусов и использование различных методологических подходов: гомологичной рекомбинации, совместной электропорации фаговой ДНК и матрицы для рекомбинации, сборки фаговой ДНК *in vitro* и *in vivo*, в том числе с использованием промежуточного хозяина *S. cerevisiae*, а также стремительно развивающегося в последнее десятилетие CRISPR/Cas-редактирования являются основой для создания генно-инженерных фаговых частиц с заданными свойствами, включая рекомбинантные фаги с измененным/расширенным спектром антибактериальной активности, перспективные для дальнейшего практического использования.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 г.) и отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

This work was supported by a grant from the Ministry of science and higher education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2019-1671 of October 31, 2019) and the branch program of Rosпотребнадзора.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература/References

- Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces. J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1394-7.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter Baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;21(3):538-82. DOI: 10.1128/CMR.00058-07
- Towner KJ. *Acinetobacter*: An Old Friend, but a New Enemy. J Hosp Infect. 2009 Dec;73(4):355-63. DOI: 10.1016/j.jhin.2009.03.032. Epub 2009 Aug 22.
- Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. Environ Health Perspect. 2013 Feb;121(2):a48-53. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.121-a48>.
- Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK. Genetically Engineered Phages: A Review of Advances Over the Last Decade Microbiol Mol Biol Rev. 2016 Jun 1;80(3):523-43. DOI: 10.1128/MMBR.00069-15. Print 2016 Sep.
- Chen Y, Batra H, Dong J, Chen C, Rao VB, Tao P. Genetic Engineering of Bacteriophages Against Infectious Diseases. Front Microbiol. 2019 May 3;10:954. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00954. eCollection 2019
- Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. Theor. Popul. Biol. 2002 Jun;61(4):471-80. DOI: 10.1006/tpbi.2002.1590.
- Мирошников КА, Чертков ОБ, Назаров ПА, Месянжинов ВВ. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов – перспективные противобактериальные агенты. Успехи биологической химии. 2006;46:65-98. / Miroshnikov KA, Chertkov OV, Nazarov PA, Mesyanzhinov VV. Peptidoglycan-liziruyushchie fermenty bakteriofagov – perspektivnye protivobakterial'nye agenty. Uspekhi biologicheskoi khimii. 2006;46:65-98. (In Russian).
- Prigent M, Leroy M, Confalonieri F. 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. Epub 2005 Jun 10.
- Srinivasiah S, Bhavsar J, Thapar K. Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. Research in Microbiology. 2008 Jun;159(5):349-57. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.04.010. Epub 2008 May 8.
- Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Haldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature. 1989;340(6233):467-468. DOI: 10.1038/340467a0
- Hatfull GF. Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. J Virol. 2015;89(16):8107-8110. DOI: 10.1128/JVI.01340-15
- Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet. 1915;186:1241-1243.
- d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. 1917;165:373-375.
- <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Ленгелер Й, Древис Г, Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты. 2005;2:496. / Lengeler I, Drevis G, Shlegel' G. Sovremennaya mikrobiologiya: Prokarioty. 2005;2:496. (In Russian).
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1951;62(3):293-300.
- Reyes A, Semenov NP, Whithson K, Rohwer F, Gordon JI Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. Nature Reviews Microbiology. 2012;10(9):607-617. DOI: 10.1038/nrmicro2853
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. Bacteriophage. 2011; 1(2):66-85. DOI: 10.4161/bact.1.2.15845
- Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends Microbiol. 1997; 5(7):268-271. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01054-8
- Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;9(9):775-785. DOI: 10.1586/eri.11.90

22. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; 11(1):69-86. DOI: 10.2174/138920110790725401
23. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci*. 2012; 13(8):699-722. DOI: 10.2174/138920312804871193
24. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(5):2141-2151. DOI: 10.1007/s00253-015-7247-0
25. <http://www.bacteriofag.ru/>.
26. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011;1(2):111-114. DOI: 10.4161/bact.1.2.14590
27. Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*. 2010;70:217248. DOI: 10.1016/S0065-2164(10)70007-1
28. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(5):317-327. DOI: 10.1038/nrmicro2315
29. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):675-687. DOI: 10.1038/nrmicro3096
30. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(5):524-531. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.028
31. Hatfull GF. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):447-453. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.004
32. Klumpp J, Fouts DE, Sozhamannan S. Next generation sequencing technologies and the changing landscape of phage genomics. *Bacteriophage*. 2012; 2(3):190-199. DOI: 10.4161/bact.22111
33. Barbirz 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; 69(2):303-316. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06311.x
34. Vegge CS, Brøndsted L, Neve H, Mc Grath S, van Sinderen D, Vogensen FK. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J Bacteriol*. 2005; 187(12):4187-4197. DOI: 10.1128/JB.187.12.4187-4197.2005
35. Spinelli S, Bebeacua C, Orlov I, et al. Cryo-electron microscopy structure of lactococcal siphophage 1358 virion. *J Virol*. 2014;88(16):8900-8910. DOI: 10.1128/JVI.01040-14
36. Murphy J, Bottacini F, Mahony J, et al. Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal *Siphoviridae* phages. *Sci Rep*. 2016; 6:21345. DOI: 10.1038/srep21345
37. Legrand P, Collins B, Blangy S, et al. The Atomic structure of the phage Tuc2009 baseplate tripod suggests that host recognition involves two different carbohydrate binding modules. *mBio*. 2016;7(1):e01781-15. DOI: 10.1128/mBio.01781-15
38. Tremblay DM, Tegoni M, Spinelli S, et al. Receptor-binding protein of *Lactococcus lactis* phages: identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. *J Bacteriol*. 2006;188(7):2400-2410. DOI: 10.1128/JB.188.7.2400-2410.2006
39. Farenc C, Spinelli S, Vinogradov E, et al. Molecular insights on the recognition of a *Lactococcus lactis* cell wall pellicle by the phage 1358 receptor binding protein. *J Virol*. 2014;88(12):7005-7015. DOI: 10.1128/JVI.00739-14.
40. Spinelli S, Veesler D, Bebeacua C, Cambillau C. Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages. *Front Microbiol*. 2014;5:3. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00003
41. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. 2007. *Molecular biology of the cell*, 5th ed. Garland Science, New York, NY.
42. Snyder L, Peters JE, Henkin TM, Champness W. 2013. *Molecular genetics of bacteria*, 4th ed. ASM Press, Washington, DC.
43. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003;421(6921):436-440. DOI: 10.1038/nature01408
44. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Recombination between homologous DNA sites, section 12.5. In Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (ed), *Molecular cell biology*, 4th ed. W H Freeman, New York, NY.
45. Loessner MJ, Rees CE, Stewart GS, Scherer S. Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(4):1133-1140.
46. Sarkis GJ, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. *Mol Microbiol*. 1995;15(6):1055-1067. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02281.x
47. Tanji Y, Furukawa C, Na SH, Hijikata T, Miyanaga K, Unno H. *Escherichia coli* detection by GFP-labeled lysozyme-inactivated T4 bacteriophage. *J Biotechnol*. 2004;114(1-2):11-20. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.05.011
48. Oda M, Morita M, Unno H, Tanji Y. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(1):527-534. DOI: 10.1128/aem.70.1.527-534.2004
49. Yoichi M, Abe M, Miyanaga K, Unno H, Tanji Y. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157:H7. *J Biotechnol*. 2005;115(1):101-107. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.003
50. Mahichi F, Synnott AJ, Yamamichi K, Osada T, Tanji Y. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 295(2):211-217. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01588.x
51. Marinelli LJ, Hatfull GF, Piuri M. Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage*. 2012; 2(1):5-14. DOI: 10.4161/bact.18778
52. Marinelli LJ, Piuri M, Swigonová Z, et al. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*. 2008; 3(12):e3957. DOI: 10.1371/journal.pone.0003957
53. Fehér T, Karcagi I, Blattner FR, Pósfai G. Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases. *Microb Biotechnol*. 2012;5(4):466-476. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00292.x
54. Shin H, Lee JH, Yoon H, Kang DH, Ryu S. Genomic investigation of lysogen formation and host lysis systems of the *Salmonella* temperate bacteriophage SPN9CC. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(1):374-384. DOI: 10.1128/AEM.02279-13
55. Poteete AR. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;201(1):9-14. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10725.x
56. Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*. 2009; 4(2):206-223. DOI: 10.1038/nprot.2008.227.
57. Smith HO, Hutchison CA 3rd, Pfannkuch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15440-15445. DOI: 10.1073/pnas.2237126100
58. Mamedov TG, Padhye NV, Viljoen H, Subramanian A. Rational *de novo* gene synthesis by rapid polymerase chain assembly (PCA) and expression of endothelial protein-C and thrombin receptor genes. *J Biotechnol*. 2007;131(4):379-387. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.08.010
59. Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Mol Syst Biol*. 2005; 1:2005.0018. DOI: 10.1038/msb4100025.
60. Jaschke PR, Lieberman EK, Rodriguez J, Sierra A, Endy D. A fully decompressed synthetic bacteriophage phiX174 genome assembled and archived in yeast. *Virology*. 2012;434(2):278-284. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.020.
61. Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing. *Cell Syst*. 2015;1(3):187-196. DOI: 10.1016/j.cels.2015.08.013
62. Hou Z, Zhou Z, Wang Z, Xiao G. Assembly of long DNA sequences using a new synthetic *Escherichia coli*-yeast shuttle vector. *Virol Sin*. 2016;31(2):160-167. DOI: 10.1007/s12250-016-3730-8

63. Shang Y, Wang M, Xiao G, et al. Construction and Rescue of a Functional Synthetic Baculovirus. *ACS Synth Biol.* 2017; 6(7):1393-1402. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00028
64. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
65. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45:273-297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430
66. Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, et al. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(5):529-536. DOI: 10.1038/nsmb.2019
67. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140
68. Hale CR, Cocozaki A, Li H, Terns RM, Terns MP. Target RNA capture and cleavage by the Cmr type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes Dev.* 2014;28(21):2432-2443. DOI: 10.1101/gad.250712.114
69. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 2009; 155(Pt 3):733-740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.
70. Stern A, Keren L, Wurtzel O, Amitai G, Sorek R. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends Genet.* 2010; 26(8):335-340. DOI: 10.1016/j.tig.2010.05.008
71. Makarova KS, Wolf YI, Irazo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67-83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
72. Tao P, Wu X, Tang WC, Zhu J, Rao V. Engineering of Bacteriophage T4 Genome Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2017; 6(10):1952-1961. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00179
73. Shen J, Zhou J, Chen GQ, Xiu ZL. Efficient Genome engineering of a virulent *Klebsiella* bacteriophage using CRISPR-Cas9. *J Virol.* 2018;92(17):e00534-18. DOI: 10.1128/JVI.00534-18
74. Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol.* 2014;11(1):42-44. DOI: 10.4161/rna.27766
75. Box AM, McGuffie MJ, O'Hara BJ, Seed KD. Functional analysis of bacteriophage immunity through a type I-E CRISPR-Cas system in *Vibrio cholerae* and its application in bacteriophage genome engineering. *J Bacteriol.* 2015; 198(3):578-590. DOI: 10.1128/JB.00747-15
76. Lauer P, Chow MY, Loessner MJ, Portnoy DA, Calendar R. Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors [published correction appears in *J Bacteriol.* 2003 Feb; 185(4):1484]. *J Bacteriol.* 2002;184(15):4177-4186. DOI: 10.1128/jb.184.15.4177-4186.2002
77. Schilling T, Dietrich S, Hoppert M, Hertel R. A CRISPR-Cas9-based toolkit for fast and precise *in vivo* genetic engineering of *Bacillus subtilis* phages. *Viruses.* 2018;10(5):241. DOI: 10.3390/v10050241.
78. Hoshiga F, Yoshizaki K, Takao N, Miyanaga K, Tanji Y. Modification of T2 phage infectivity toward *Escherichia coli* O157:H7 via using CRISPR/Cas9. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(4):fnz041. DOI: 10.1093/femsle/fnz041.

Информация об авторах:

Щурова Анастасия Сергеевна, студент шестого курса
ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»
Адрес: 141701, Институтский переулок, 9, г. Долгопрудный,
Московская область

Баннов Василий Александрович, старший научный сотрудник
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область

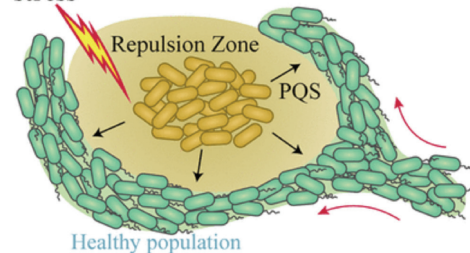
Information about authors:

Anastasia S. Schurova, sixth year student, the Moscow State Institute
of Physics and Technology (National Research University)
Address: 141701, 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow Region,
Russian Federation

Vasily A. Bannov, senior researcher, State Research Center for Applied
Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation

НОВОСТИ НАУКИ**Как бактерии «действуют как единое целое», чтобы избежать антибиотиков**

Исследовали влияние бактериофаговой инфекции и лечения антибиотиками на координацию роения, коллективной формы жгутико-опосредованной подвижности бактерий. Показано, что фаговая инфекция оппортунистического бактериального патогена *Pseudomonas aeruginosa* устраняет подвижность роя в зараженной субпопуляции и индуцирует высвобождение сигнальной молекулы PQS *Pseudomonas quinolone*, которая отталкивает неинфицированные субпопуляции от попадания в зараженную область. Эти механизмы имеют общий эффект ограничения инфекции субпопуляции, что способствует ее выживанию. Антибактериальная обработка *P. aeruginosa* вызывает тот же ответ, устраняя подвижность роя и отталкивая приближающиеся скопления от зоны, обработанной антибиотиком, через PQS-зависимый механизм. Рой полностью отталкивается от зоны *P. aeruginosa*, обработанной антибиотиками, что соответствует форме уклонения от антибиотиков, и не отталкивается только антибиотиками. PQS выполняет несколько функций, в том числе выполняет функции quorum-sensing молекулы, активирует реакцию окислительного стресса и регулирует высвобождение вирулентности и факторов, модифицирующих хозяина. PQS служит также сигналом предупреждения о стрессе, который заставляет большую популяцию физически избегать клеточного стресса. Реакция на стресс на коллективном уровне, наблюдаемая здесь у *P. aeruginosa*, согласуется с механизмом, способствующим выживанию бактериальных популяций.

Phage, antibiotic stress

Bru J.-L. et al.

PQS Produced by the Pseudomonas aeruginosa Stress Response Repels Swarms Away from Bacteriophage and Antibiotics
J Bacteriol. 2019;201(23):e00383-19. DOI: 10.1128/JB.00383-19

Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

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

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

Требования к оформлению статьи.

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

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

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org