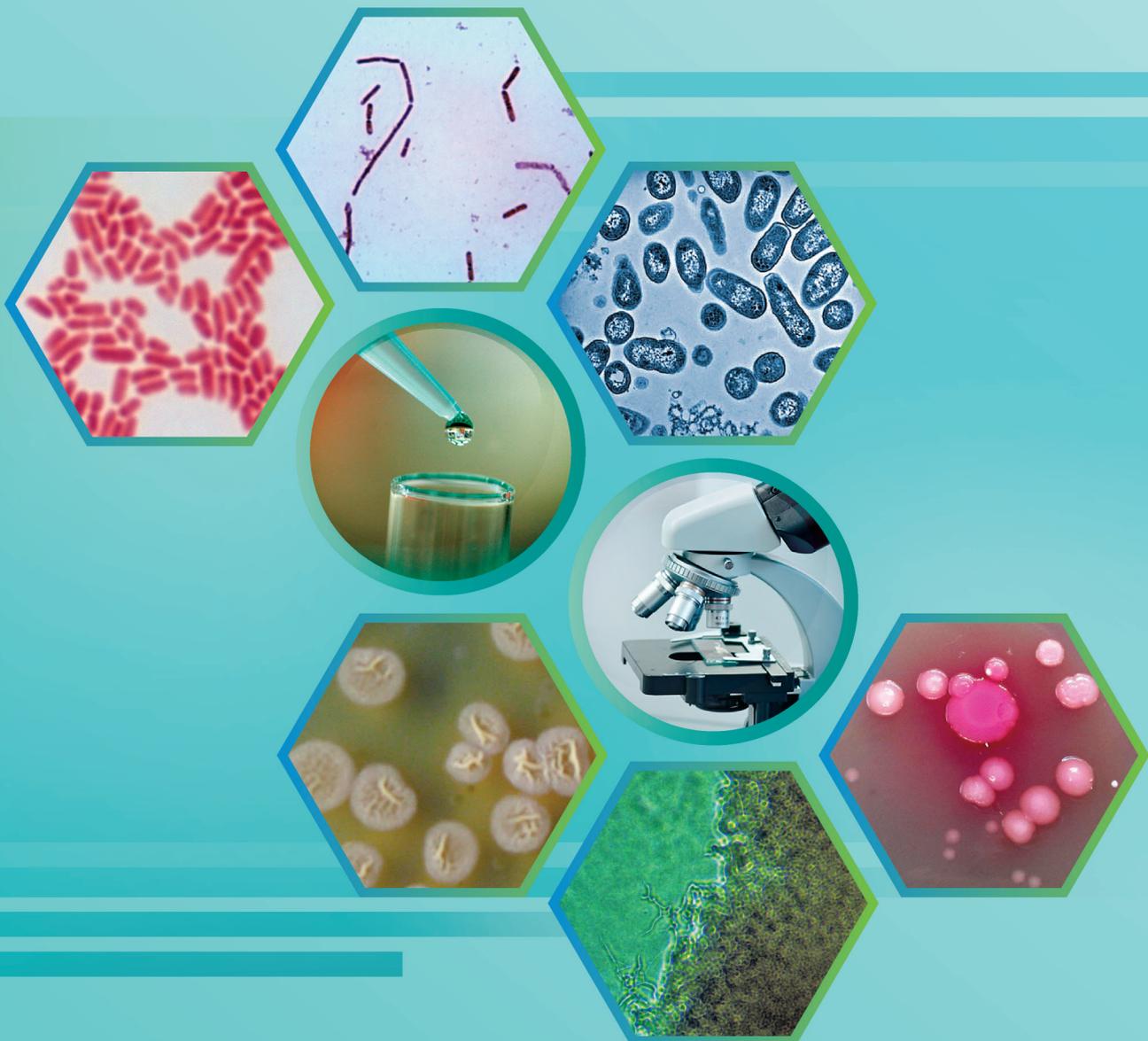


# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology

Бактериология · том 5 · №2 · 2020



2020 • ТОМ 5 • №2

ISSN 2500-1027

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

## Главный редактор

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

## Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.  
(Россия)

## Редакционный совет

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

## Редколлегия

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

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

Подписано в печать 15.09.2020 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  
ПИ №ФС 77-66792 от 15.08.2016 г.

Журнал «Бактериология»  
является рецензируемым изданием.

Выходит четыре раза в год.  
Основан в 2016 году.

Редакция не несет ответственности  
за содержание рекламных материалов.

Тираж 1000 экз. Цена свободная.

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

Подписной индекс по объединенному  
каталогу «Пресса России»: 39920

---

## Колонка главного редактора

- К вопросу о применении экспресс-методов выявления антибиотикорезистентности  
в условиях эпидемии коронавирусной инфекции ..... **5**

---

## Экспериментальные статьи

- Морфологические аспекты формирования микробной биопленки на фрагментах  
атеросклеротических бляшек пациентов  
*В.Н.Царёв, Е.Н.Николаева, М.В.Витович, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов* ..... **8**
- Характеристика чувствительности к антибиотикам штаммов *Shigella sonnei*,  
выделенных от пациентов из очагов шигеллезов, возникших  
в Северо-Западном федеральном округе в 2018 году  
*М.А.Макарова, З.Н.Матвеева, Л.А.Кафтырева, Е.А.Михайлова, М.А.Кузакова, О.И.Лаушкина,*  
*Т.М.Кузьмина, О.Е.Самсонова, Л.И.Алексеевко, И.А.Постнова, Л.М.Фёдорова* ..... **18**
- Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli*  
с целью применения в ветеринарных лабораториях  
*Ю.А.Скоморина, А.А.Кремлева, Л.Ш.Ахметова, Т.А.Подольская, А.П.Шепелин, О.В.Полосенко* ..... **24**
- Результаты мониторинга требований биологической безопасности в ветеринарных лабораториях  
*Л.В.Чекан, Е.А.Тюрин* ..... **33**

---

## Обзорные статьи

- CRISPR/Cas-системы: характеристика и возможности использования для редактирования геномов бактерий  
*И.А.Блатов, А.С.Щурова, Д.Ю.Гущин, С.Д.Зверева, А.В.Попова* ..... **38**
- Молекулярно-генетические методы изучения биопленок микроорганизмов  
*Е.В.Детушева, П.В.Слукин, Н.К.Фурсова* ..... **49**
- Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной  
шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 1  
*Э.А.Светоч, И.А.Дятлов, Н.Н.Карцев, Б.В.Ерусланов, М.Е.Канашенко, Н.К.Фурсова* ..... **56**
- Правила оформления статей (основные положения) ..... **72**

# BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

## Editor-in-Chief

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

## Executive Secretary

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

---

## Editorial Council

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

---

## Editorial Board

Ad"yaasᠠren Zeviiymadagiin, 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

- On the question of the use rapid express-methods for determining antibiotic resistance during an epidemic of coronavirus infection . . . . . **5**

---

## Experimental Articles

- Morphological aspects of microbial biofilm formation on atherosclerotic plaque fragments  
*V.N.Tsarev, E.N.Nikolaeva, M.V.Vitovich, M.S.Podporin, E.V.Ippolitov* . . . . . **8**
- Characteristics of susceptibility to antibiotics of *Shigella sonnei* caused three outbreaks in the North-Western region of Russia in 2018  
*M.A.Makarova, Z.N.Matveeva, L.A.Kaftyreva, E.A.Mikhailova, M.A.Kuzakova, O.I.Laushkina, T.M.Kuzmina, O.E.Samsonova, L.I.Alekseenko, I.A.Postnova, L.M.Fedorova* . . . . . **18**
- Comparative evaluation of nutrient media of *Escherichia coli* isolating for using in veterinary laboratories  
*Yu.A.Skomorina, A.A.Kremleva, L.Sh.Akhmetova, T.V.Podolskaya, A.P.Shepelin, O.V.Polosenko* . . . . . **24**
- Results of monitoring of biological safety requirements in veterinary laboratories  
*L.V.Chekan, E.A.Tyurin* . . . . . **33**

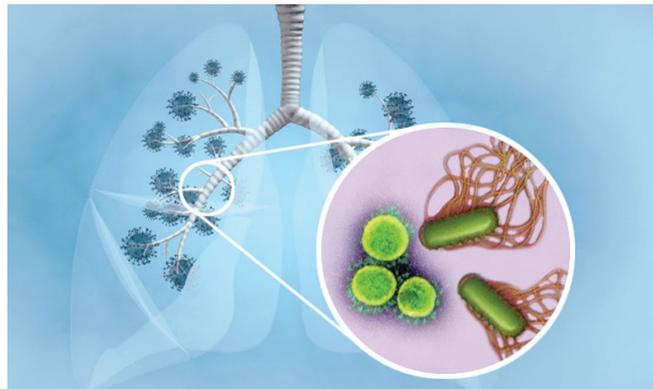
---

## Review Articles

- CRISPR/Cas-Systems: characteristics and possibilities of use for editing bacterial genomes  
*I.A.Blatov, A.S.Shchurova, D.Y.Guschin, S.D.Zvereva, A.V.Popova* . . . . . **38**
- Molecular-genetic methods for studying microbial biofilms  
*E.V.Detusheva, P.V.Slukin, N.K.Fursova* . . . . . **49**
- Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 1  
*E.A.Svetoch, I.A.Dyatlov, N.N.Kartsev, B.V.Eruslanov, M.E.Kanashenko, N.K.Fursova* . . . . . **56**
- Instructions for Authors . . . . . **72**

# К вопросу о применении экспресс-методов выявления антибиотикорезистентности в условиях эпидемии коронавирусной инфекции

**Ш**ирокое распространение устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам приобрело угрожающие размеры еще в доковидный период. С развитием эпидемии COVID-19 во всех странах мира значение резистентности существенно возросло в связи с двумя проблемами – присоединением бактериальной инфекции при поражении вирусом легочной ткани, особенно в условиях применения искусственной вентиляции легких, и появлением новых вариантов патогенов с широким спектром устойчивости при массовом применении различных антибиотиков для купирования осложнений у больных коронавирусной инфекцией. Кроме того, пока не ясны последствия перенесенной коронавирусной инфекции для пациентов, относительно их устойчивости к заражению бактериальными агентами через бронхолегочную систему.



Все эти новые проблемы требуют разработки и внедрения ускоренных методов выявления патогенов и спектра их устойчивости к антимикробным препаратам, прежде всего к антибиотикам, от чего зависит оперативность принятия решения о тактике лечения. Для определения резистентности в клиниках широко используются фенотипические методы определения чувствительности: диск-диффузионный метод, метод микроразведений в бульоне, эллипсометрический метод, а также применяются автоматические бактериологические анализаторы для определения антибиотикочувствительности: Phoenix (Becton Dickinson), VITEK 2 (bioMérieux), WalkAway (Beckman Coulter), Sensititre (Thermo Scientific) и др.

Вышеописанные методы позволяют выявить широкий спектр чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам, являются относительно недорогими и стандартизованными. Однако в условиях необходимости применения в экстренных случаях они мало пригодны из-за длительности постановки реакций.

Недостатком фенотипического определения чувствительности является необходимость выделения чистой культуры возбудителя, на что уходит от одних до трех суток, и только после этого идет постановка теста на чувствительность. Автоматические бактериологические анализаторы в некоторых случаях способны выдать результат спустя 8 ч. Таким образом, оперативное назначение адекватной этиотропной антибиотикотерапии является невозможным. Кроме того, оборудование, реактивы и расходные материалы для данных целей в основном зарубежного производства, имеют высокую стоимость и закупаются по длительным конкурсным процедурам.

Альтернативой фенотипическому определению чувствительности бактерий является применение молекулярно-генетических методов исследований, основанных на детекции генов, ответственных за формирование устойчивости возбудителя. Основным преимуществом применения таких методов является быстрое получение результата – до 3 ч от момента постановки теста. Такие тесты могут быть поставлены и без выделения чистой культуры, что позволяет выявить весь комплекс известных генов резистентности. Однако следует иметь в виду, что наличие генов устойчивости еще не гарантирует их экспрессию (фенотипическое проявление), а присутствие в пробе сапрофитов, которые часто несут гены резистентности, делает информацию об устойчивости избыточной и не полностью достоверной.

Некоторые российские компании для определения генов резистентности предлагают ряд тест-систем в формате ПЦР-РВ, применение которых возможно на амплификаторах как зарубежного, так и отечественного производства. Однако, как правило, такие системы определяют один ген устойчивости и не имеют мультиплексного формата. При таком подходе целевые гены должны быть сгруппированы по типам, например по различным видам наиболее распространенных бета-лактамаз. Но и в этом случае широкий скрининг генов резистентности в нативном материале невозможен.

В развитии этого генодиагностического метода наиболее перспективным является создание ДНК и белковых биологических чипов с большим количеством точек считывания для эффективного скрининга. Такие работы ведутся, но нет сведений о выходе их на рынок в ближайшее время. Чипы, но с малым количеством точек, разработаны и выпускаются в нашей стране только для возбудителя туберкулеза.

Генодиагностическое направление в выявлении устойчивости получило развитие при использовании технологии мономолекулярного нанопорового секвенирования, которая позволяет приступить к анализу полученных данных в течение 10 мин после начала секвенирования. Общее время, затраченное на выполнение исследований и получение первичного результата, может составлять 4 ч. В данном случае достаточно быстро может быть проанализирован весь спектр генов устойчивости в пробе, хотя проблема экспрессии и генов сапрофитов, о которой говорилось выше, остается. Преодолеть эту проблему при данном подходе можно, если биоинформатический анализ проводить не только по генам устойчивости, но и по специфическим генам, по которым идентифицируется возбудитель с использованием соответствующей базы данных. Эту технологию можно считать наиболее перспективной для оперативного принятия решения о тактике антибиотикотерапии. Недостатки метода – отсутствие отечественных приборов для нанопорового секвенирования и трудности их получения в настоящий период от производителей, необходимость в квалифицированном персонале, высокая стоимость реагентов. Однако бурное развитие метагеномного анализа, высокая производительность миниатюрных приборов и их постоянное совершенствование, повышение эффективности биоинформатики позволяют считать, что такой подход будет иметь явное превосходство над другими в будущем.

Следует упомянуть еще один из перспективных методов, связанных с использованием масс-спектрометрии для детекции продуктов генов антибиотикорезистентности. Он уже используется при определении продуктов различных карбапенемаз и бета-лактамаз в чистой бульонной культуре с чувствительностью и специфичностью более 95%. Однако пробоподготовка к данному исследованию является достаточно трудоемкой, отсутствуют базы данных спектров для идентификации продуктов генов резистентности, стоимость приборов высока, они малодоступны для клинических лабораторий. Привлекает в этом методе то, что в пробе выявляется конкретный продукт, обеспечивающий устойчивость бактерий к определенному классу антибиотиков, что существенно облегчает выбор тактики терапии. Появление новых высокоэффективных масс-спектрометров, их миниатюризация позволяют надеяться на то, что этот метод будет доведен до практического использования.

Какие же методы, не требующие больших затрат и дополнительного дорогостоящего оборудования, могут быть использованы в настоящее время для решения проблемы ускоренного определения резистентности бактерий в пробах биологического материала?

Прежде всего это планшеты для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антимикробных препаратов. Необходимо создание производства 96-луночных планшетов, в которых находятся антимикробные препараты в стандартных двойных разведениях для определения МПК. Эти планшеты могут быть использованы в лабораториях без автоматов, в ручном режиме: в них добавляют суспензию микроорганизма и после инкубации в течение ночи визуально проводят учет результатов. При этом в одном планшете можно разместить до 20 антимикробных препаратов. Кроме того, необходимо запланировать создание достаточно простого отечественного анализатора, позволяющего работать с планшетами в автоматическом режиме.

Еще одной реальной возможностью для решения данного вопроса является создание и организация производства ПЦР-РВ-тест-систем для детекции генов антибиотикорезистентности. Такая система позволит за одну постановку теста в стрипе (8 лунок) детектировать от 24 до 32 маркеров устойчивости к антимикробным препаратам, что, в свою очередь, даст возможность получить достаточно полную картину спектра устойчивости возбудителя и позволит клиницисту в короткие сроки назначить адекватную антибиотикотерапию или скорректировать уже назначенную. Необходимо разработать такие тест-системы отдельно для Gr- и Gr+ микроорганизмов, так как они различаются механизмами формирования резистентности. Это возможно в формате 96-луночного планшета с лиофилизированной готовой реакционной смесью, содержащей все необходимые компоненты для проведения реакции. Также необходима разработка системы выделения нуклеиновых кислот из клинического материала или выделенных культур штаммов бактерий.

Таким образом, в настоящее время существует не так много возможностей использования экспресс-тестов для выявления антимикробной резистентности. Настоятельно необходимы научные разработки в данной области, которые позволят создать линейку отечественных препаратов и приборов для решения данного вопроса, который особенно остро стоит сейчас, во время развития эпидемии нового коронавируса.

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

# Морфологические аспекты формирования микробной биопленки на фрагментах атеросклеротических бляшек пациентов

В.Н.Царёв, Е.Н.Николаева, М.В.Витович, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова», Москва, Российская Федерация

Современные исследования свидетельствуют о наличии в атеросклеротических бляшках живых бактерий. Однако потенциал микробов в образовании биопленок в артериальных бляшках не изучен.

**Цель исследования.** Выявление биопленок на фрагментах артериальных сосудов с атеросклеротическими бляшками.

**Материалы и методы.** Фрагменты атеросклеротических бляшек, удаленные при аортокоронарном шунтировании больных ишемической болезнью сердца, культивировали в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях *in vitro* в течение 1 или 14 суток. Наличие биопленок оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии.

**Результаты.** Во всех фрагментах атеросклеротических бляшек после культивирования *in vitro* выявлены смешанные биопленки, представленные бактериями палочковидной и кокковой форм. Характерная ультраструктура позволила выявить основные этапы жизненного цикла биопленки.

**Выводы.** Моделирование биопленок на биотических поверхностях в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях позволяет подробно изучить фенотип биопленок и обеспечить существенное понимание патофизиологии инфекционных процессов в кровеносных сосудах и атеросклеротических бляшках.

**Ключевые слова:** атеросклеротическая бляшка, биопленкообразующие микробы, пародонтопатогены, возбудители нозокомиальных инфекций, технология текучих сред

**Для цитирования:** Царёв В.Н., Николаева Е.Н., Витович М.В., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Морфологические аспекты формирования микробной биопленки на фрагментах атеросклеротических бляшек пациентов. Бактериология. 2020; 5(2): 8–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-8-17

## Morphological aspects of microbial biofilm formation on atherosclerotic plaque fragments

V.N.Tsarev, E.N.Nikolaeva, M.V.Vitovich, M.S.Podporin, E.V.Ippolitov

Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Modern research indicates the presence of living bacteria in atherosclerotic plaques. However, the potential of microbes in the formation of biofilms in arterial plaques has not been studied.

**Purpose of the study.** Identification of biofilms on fragments of arterial vessels with atherosclerotic plaques.

**Materials and methods.** Fragments of atherosclerotic plaques isolated during coronary artery bypass grafting in patients with coronary artery disease were cultured in an exhaustive fluid system under anaerobic conditions *in vitro* for 1 or 14 days. The presence of biofilms was evaluated using scanning electron microscopy.

**Results.** Mixed biofilms, represented by rod-shaped bacteria and cocci, were identified after *in vitro* cultivation in all fragments of atherosclerotic plaques. The characteristic ultrastructure revealed the main stages of the biofilm life cycle.

**Conclusions.** Modeling biofilms on biotic surfaces in a system of exhausted fluids under anaerobic conditions will allow us to study in detail the phenotype of biofilms and provide a significant understanding of the pathophysiology of infectious processes in blood vessels and atherosclerotic plaques.

**Key words:** atherosclerotic plaque, chronic periodontitis, biofilm-forming microbes, periodontal pathogens, causative agents of nosocomial infections, fluid technology

**For citation:** Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Vitovich M.V., Podporin M.S., Ippolitov E.V. Morphological aspects of microbial biofilm formation on atherosclerotic plaque fragments. Bacteriology. 2020; 5(2): 8–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-8-17

### Для корреспонденции:

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Телефон: (495) 609-6700

E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Статья поступила 30.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Elena N. Nikolaeva, MD, PhD, DSc, professor, chief researcher in the molecular biology research laboratory of the Medical Dental Research Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry

Address: 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (495) 609-6700

E-mail: elnikolaeva@bk.ru

The article was received 30.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

**К**онцепции формирования микробных биопленок уделяется большое внимание при оценке патологии внутренних органов инфекционного и неинфекционного генеза. Биопленка представляет собой «структурированный консорциум микробных клеток, окруженный полимерной матрицей, продуцируемой самими микробами» [1]. В матрицу биопленки помимо микробов могут быть интегрированы компоненты организма-хозяина, такие как фибрин, тромбоциты или иммуноглобулины. Как бактерии, так и грибы могут вызывать биопленочные инфекции, а биопленки могут состоять из микробов одного вида или быть полимикробными [1–5].

Биопленочные инфекции характеризуются хронической, персистирующей и постепенно прогрессирующей патологией, обусловленной прежде всего воспалительной реакцией в участках, окружающих биопленку. По этой причине многие из них трудно диагностировать и эффективно лечить [6].

Размеры биопленок обычно малы *in vivo*, в тканях 4–200 мкм, на инородных телах 5–1200 мкм [7]. В связи с этим поиск биопленок в клинических образцах может быть трудным и длительным и приводить к ложноотрицательным результатам, если образцы не представляют очаг инфекционной биопленки. Современные исследования свидетельствуют о возможном наличии в атеросклеротических бляшках живых бактерий [8–11]. Однако потенциал микробов в образовании биопленок в артериальных бляшках мало изучен.

**Цель исследования:** выявление микробных биопленок на фрагментах артериальных сосудов с атеросклеротическими бляшками у пациентов кардиологического профиля.

### Материал и методы

Исследуемый материал (фрагменты сосудов) получали во время проведения аортокоронарного шунтирования, связанного с атеросклеротическим поражением, и немедленно помещали в стерильные транспортные системы со средой AmiesTransport, контрольные образцы – в 10%-й раствор нейтрального формалина. Пробирки с выделенными фрагментами доставляли в течение 2 ч в лабораторию молекулярно-биологических исследований МГМСУ и лабораторию анатомии микроорганизмов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ.

Исследуемые образцы:

1. отобраны интраоперационно и фиксированы в 10%-м растворе нейтрального формалина (контрольные),
2. культивированы в системе истощаемых текучих сред и анаэробных условиях 1 сутки, после чего также фиксированы в формалине,
3. культивированы в системе истощаемых текучих сред и анаэробных условиях 14 суток, затем фиксированы в формалине.

Макроскопически определяемую внутреннюю поверхность сосуда анализировали с помощью электронного микроскопа. При наличии на внутренней поверхности образца области желтого цвета, в которой предположительно была сформирована атеросклеротическая бляшка, острым лезвием отсекали как фрагмент желтого цвета, так и рядом расположенную область белого цвета.

Участки сосудов с атеросклеротическими бляшками (№2, №3), доставленные в стерильных транспортных системах со средой AmiesTransport, использовали для получения отпечатка на плотной питательной среде M832, а затем помещали в жидкую питательную среду M863 для селективного выделения неспоровых анаэробов (FD001, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Анаэроостат (HiAnaerobic System Mark VI) с посевами в бескислородной газовой смеси: H<sub>2</sub> (10%), CO<sub>2</sub> (10%) N<sub>2</sub> (80%) помещали в орбитальный шейкер-инкубатор «ES-20» (Biosan, Латвия) и инкубировали при температуре 36,9°C, скорости вращения 90 об./мин в течение 1 и 14 дней согласно патенту РФ [12].

Для контроля стерильности забора исследуемого материала и условий культивирования проводили посев на плотную питательную среду M832 транспортной среды, в которой были доставлены образцы в лабораторию; чашку Петри с питательной средой M832 и флакон с жидкой питательной средой M863 без посева.

Микротопографию биопленок оценивали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), которую проводили согласно методике, описанной Диденко Л.В. и соавт. (2015) [13]. Фиксированные в 10%-м растворе нейтрального формалина фрагменты сосудов высушивали при комнатной температуре в течение 10 мин, монтировали на алюминиевые столики с помощью угольного клея и напыляли золотом (толщина слоя 10 нм) в установке «SPI-MODULE SputterCoater» (SPI Supplies, США). Анализ образцов проводили с помощью сканирующего двулучевого электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEICompany, США) в режиме высокого вакуума, при ускоряющем напряжении 5 кВ.

Исследование являлось предварительным и не носило сравнительного характера, поэтому для анализа результатов использованы методы описательной статистики.

### Результаты и обсуждение

Проведено культивирование в системе с истощаемой текучей средой и анаэробных условиях фрагментов атеросклеротических бляшек, выделенных у 12 больных ИБС и хроническим пародонтитом, в возрасте от 54 до 74 лет, находившихся на хирургическом лечении в Институте коронарной и сосудистой хирургии Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева.

Бактериальный рост в контрольных посевах отсутствовал. Тем не менее на внутренней поверхности интраоперационно фиксированных формалином образцов выявлены единично расположенные бактерии.

На рис. 1 представлен участок внутренней поверхности контрольного образца с единичными бактериями овоидной формы. На другом участке этого же образца видно несколько бактерий, расположенных в виде короткой цепочки (рис. 2).

Можно предположить, что наличие микробов на внутренней поверхности интраоперационно фиксированного образца свидетельствует о случайной адгезии бактерий в результате бактериемии либо о нахождении бактерий в атеросклеротической бляшке. Попадание бактерий из воздуха во время операции либо внесение микробов инструментами при последующих манипуляциях, связанных с приготовлением препарата для СЭМ, маловероятно вследствие строгого

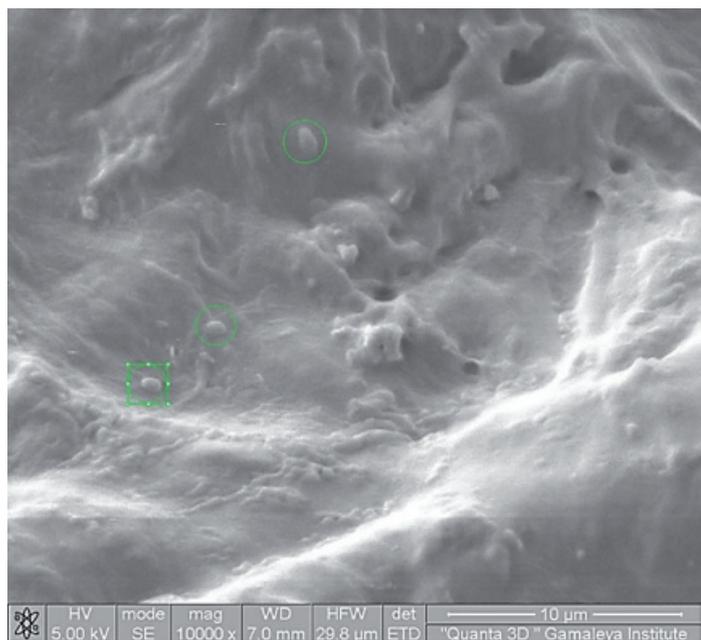


Рис. 1. СЭМ внутренней поверхности интраоперационно фиксированного кровеносного сосуда,  $\times 10\ 000$  (образец №1).

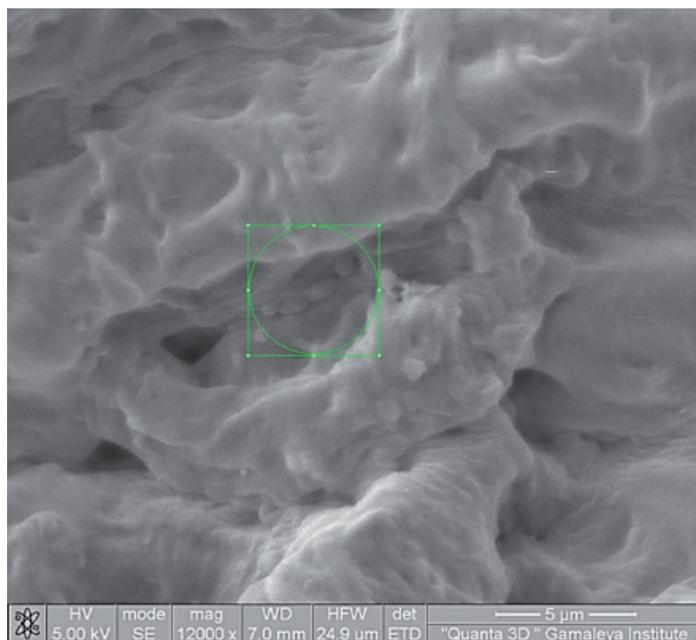


Рис. 2. СЭМ внутренней поверхности образца №1,  $\times 12\ 000$ .

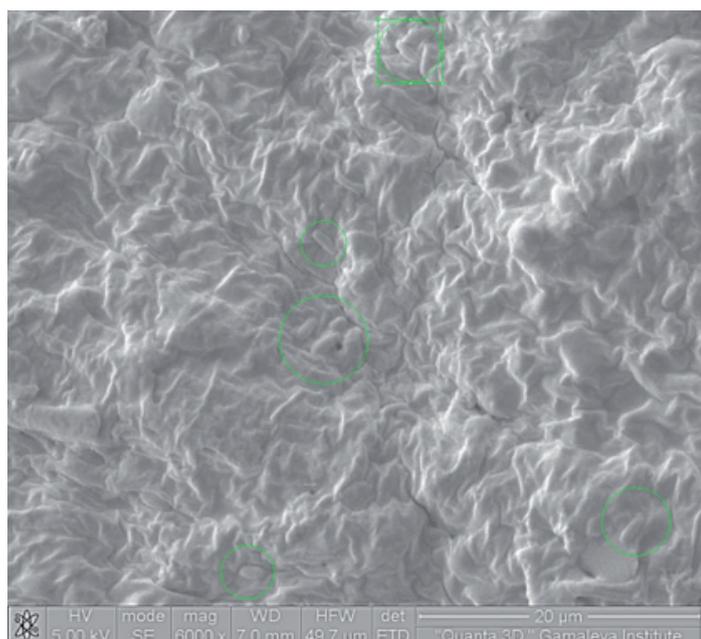


Рис. 3. СЭМ поверхности образца №2 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 6000$ .

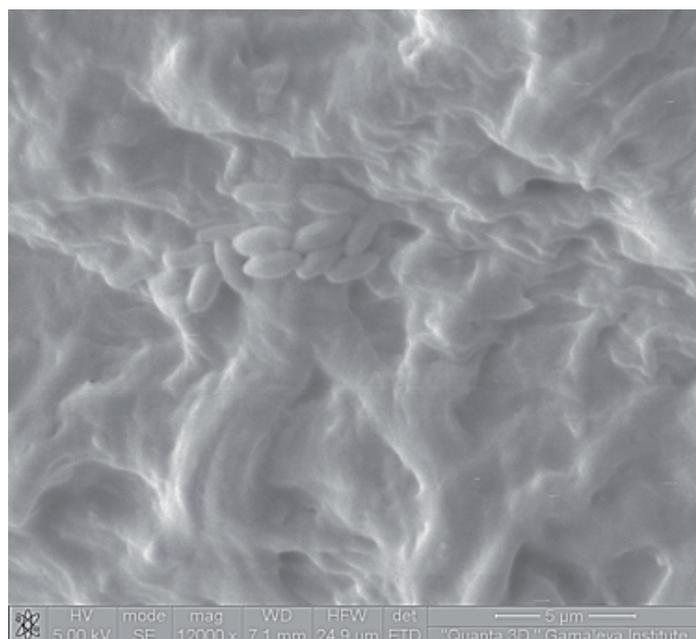


Рис. 4. СЭМ поверхности образца №2 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 10\ 000$ .

соблюдения условий асептики, а также явного расположения цепочки микробов в углублении кровеносного сосуда.

Во флаконах с фрагментами атеросклеротических бляшек наблюдалось помутнение питательной среды через 24 ч культивирования и наличие осадка на дне пробирки, свидетельствующие о появлении в них планктонных форм микробов. На поверхности образца №2 (24 ч инкубации) обнаружены единичные бактерии и их скопления, а также бактерии, покрытые гомогенным веществом (рис. 3). Выявлены участки микроколоний (отличительный признак образования биопленок с помощью автоагрегации бактерий на поверхности).

Морфологически отличить экзополисахаридный матрикс биопленки бактерий от внеклеточного матрикса ткани дан-

ного сосуда не представлялось возможным. Бактерии имели овоидную и палочковидную форму. Их размеры варьировали от 1,90 до 2,50 мкм (рис. 3–5).

На поверхности фрагмента сосуда №3 выявлены участки с отдельно лежащими бактериями, частично покрытые экзоклеточным матриксом (рис. 6, 7). Но большей частью поверхность этого сосуда была покрыта биопленкой с выраженной мантией (рис. 8).

Фрагмент сосуда №4 был покрыт смешанной биопленкой с выраженным внеклеточным матриксом (рис. 9, 10).

Встречались области биопленки со скоплениями бактерий, матриксом не покрытые (рис. 11).

Свободные от матрикса бактерии имели множественные инвагинации клеточной оболочки (рис. 12).

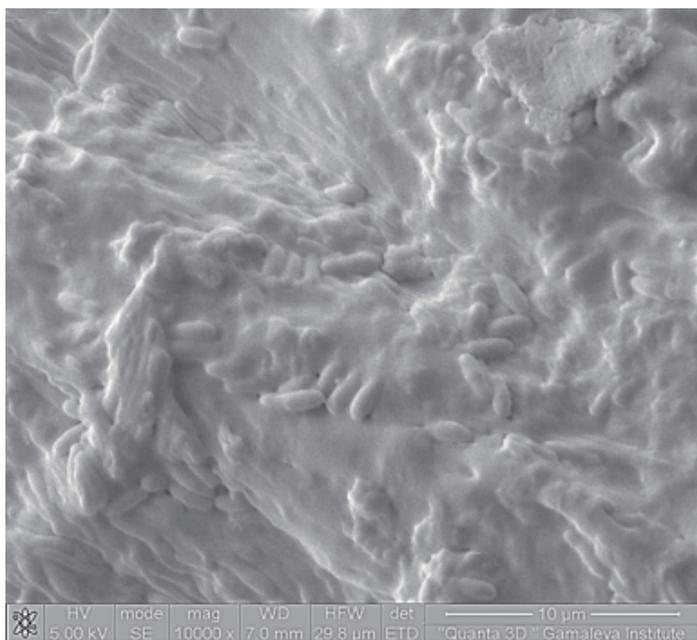


Рис. 5. СЭМ участка образца №2 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 10\,000$ .

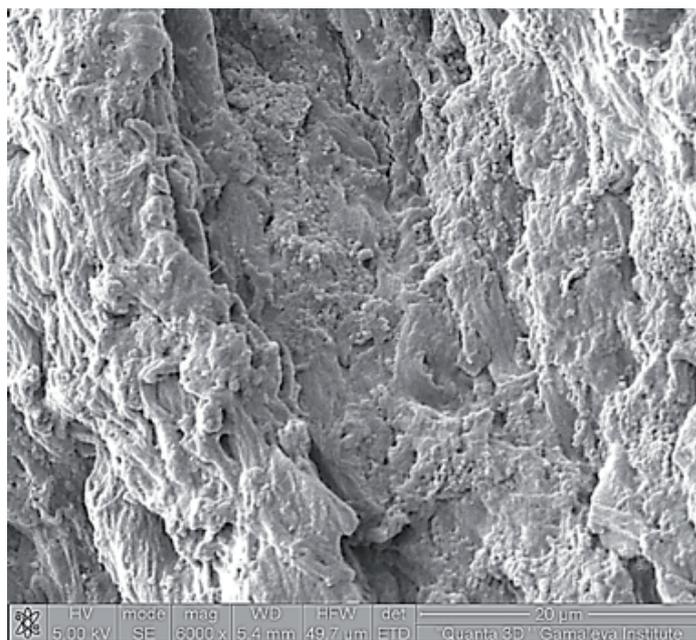


Рис. 6. Рельеф поверхности сосуда №3 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 6000$ .

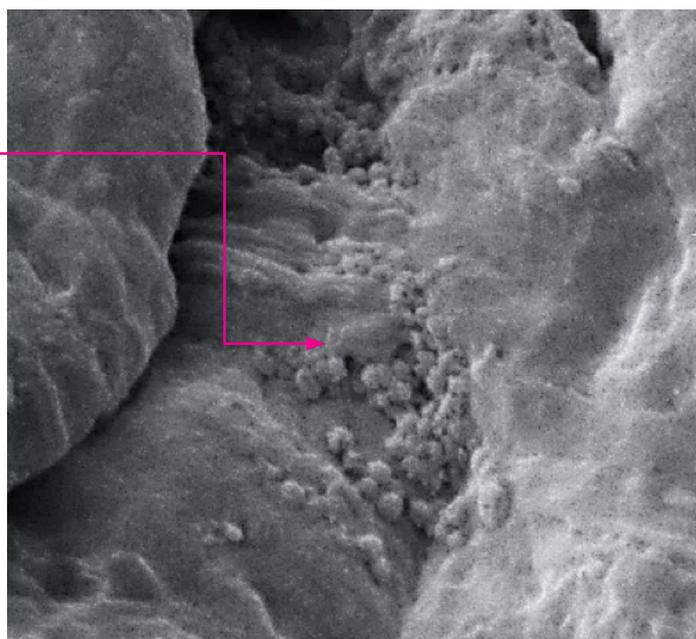
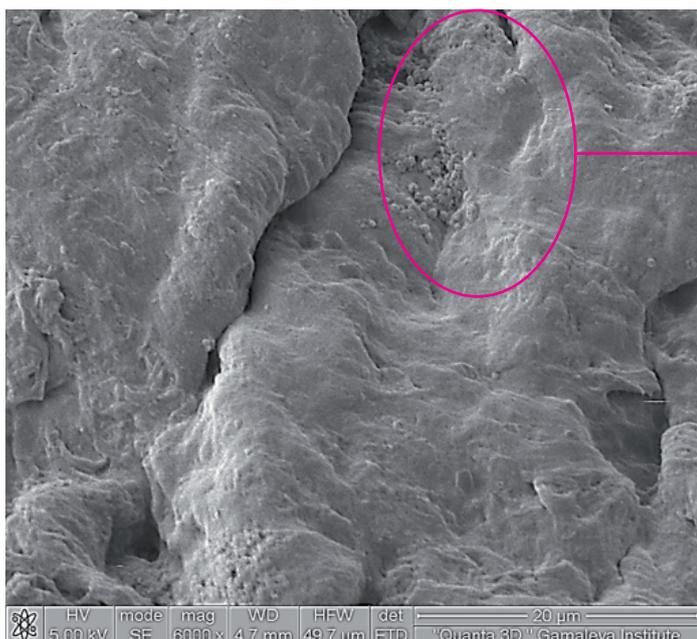


Рис. 7. СЭМ поверхности образца сосуда №3 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 6000$  и  $\times 10\,000$ .

Следовательно, на поверхности культивируемых биопатов наблюдался рост микробов, образующих биопленку. Участки с поверхностно расположенными бактериями, не покрытые экзоклеточным матриксом, по-видимому, связаны с их дальнейшим распространением в планктонной форме. Фрагменты зрелых биопленок могут отслаиваться и растрескиваться. Наличие полых пустот также свидетельствует о формировании зрелой биопленки [14, 15].

На поверхности фрагмента сосуда №5, культивированного в течение 14 суток в системе с текучей истощаемой средой в анаэробных условиях, в области белого цвета также выявлена смешанная биопленка с выраженной экзоклеточной мантией (рис. 13–15).

Особенностью фрагмента, изображенного на рис. 13, являются кальцинаты, свободные от бактерий.

Таким образом, на поверхностях всех образцов из атеросклеротических бляшек были выявлены многочисленные участки бактериальной биопленки. Они имели смешанный характер, т.е. были представлены разнообразными морфологическими вариантами микробиоты: бактериями палочковидной, овоидной и кокковой форм. Размеры палочковидных бактерий варьировали от 1,14 до 2,42 мкм ( $1,71 \pm 0,35$  мкм). Встречались участки смешанной биопленки, состоящей из кокков и палочек, некоторые из которых достигали 3,5–5,15 мкм. Размеры овоидных клеток варьировали в пределах 700,26–785,54 нм ( $745,15 \pm 24,24$  нм), а кокков – от 267,12 до 578,43 нм ( $396,81 \pm 99,64$  нм).

Типичный экзоклеточный матрикс выявлен в образцах сосудов №4 и №5. Скопления бактерий, не покрытых матриксом, обнаружены в образце №3. Для представленных в этом

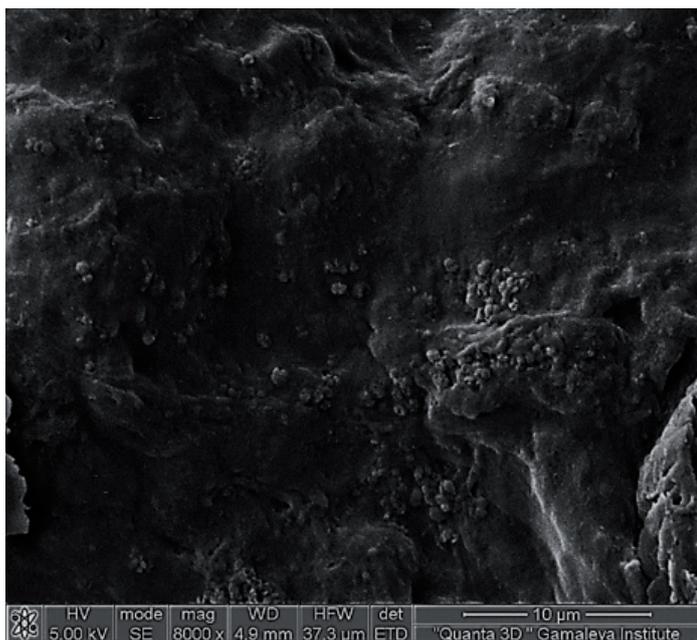


Рис. 8. СЭМ поверхности образца сосуда №3 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×8000.

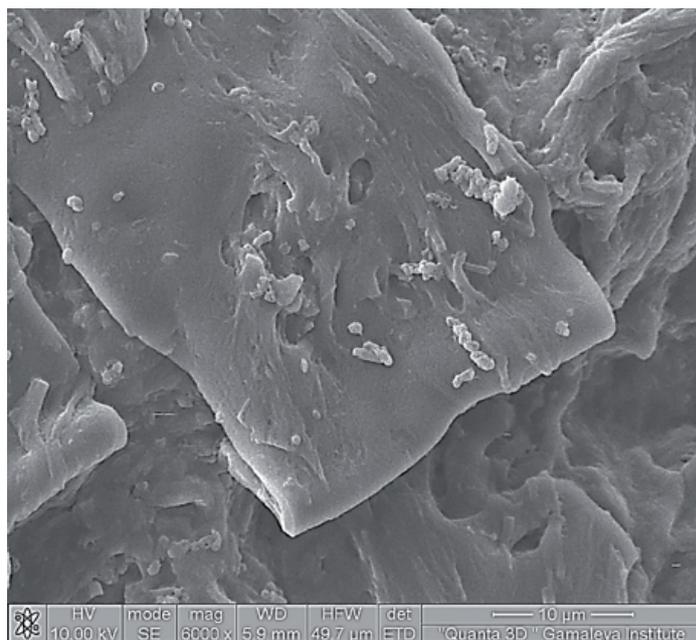


Рис. 9. Рельеф поверхности сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×6000.

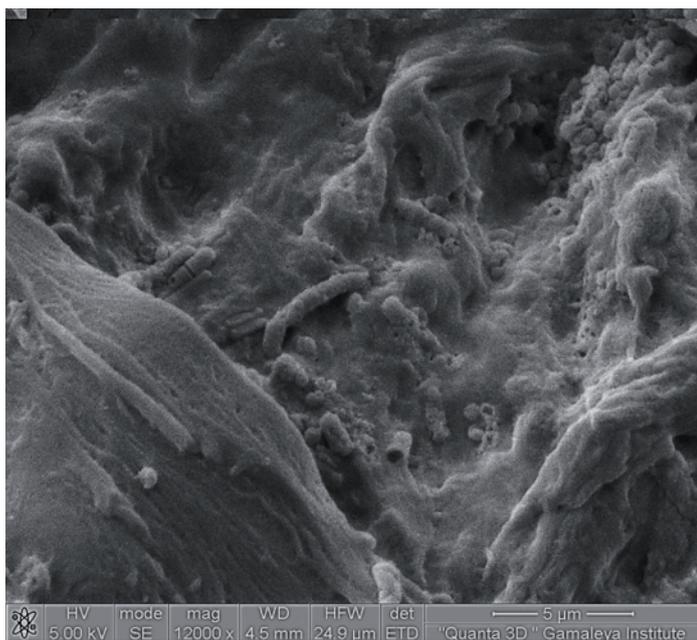


Рис. 10. Поверхность сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×8000.

образце микробов были характерны наиболее выраженные изменения их структурной организации. Несмотря на разницу макроскопической картины отдельных фрагментов образца №5, во всех участках было выявлено наличие биопленки с характерной ультраструктурой.

Обширные исследования позволили оценить жизненный цикл биопленки, который включает три основных этапа: (а) начальная адгезия, (б) накопление и (в) дисперсия [16].

Условием образования биопленки, кроме присутствия микробов, является наличие относительно плотной и увлажненной поверхности неорганического или органического происхождения [17]. Соответственно, поверхность кровеносных сосудов удовлетворяет этому условию.

На представленных нами микрофотографиях можно проследить элементы классических этапов образования биопленок.

Это адгезия одиночных бактерий к поверхности (образец №1). Колонизация – межклеточная адгезия и образование микроколоний с начальным этапом синтеза экзоклеточного матрикса (образец №2). Созревание и формирование сложных полимикробных биопленок (образец №3). Выделение или дисперсия планктонных форм микробов в окружающую (в нашем случае – культуральную) среду (образцы №4 и №5).

Известно, что некоторые биопленки прилипают к естественным или искусственным поверхностям в организме (включая устройства), в то время как другие могут состоять из агрегатов, связанных, но не прилипших непосредственно к поверхности [3, 7]. По-видимому, микробы из подобных участков биопленки в нашей системе довольно быстро переходили в планктонную форму, хотя в последующем могли адгезировать на более подходящие для них участки.

Микробы с дефектной клеточной стенкой могут появляться в зрелых многоклеточных биопленках при индукции программируемой гибели клеток, включающей братоубийство, альтруистический аутолиз и, возможно, каннибализм при истощении питательных веществ [17, 18]. В подобных условиях бактериальная популяция, по-видимому, существует как многоклеточный организм, состоящий из субпопуляций с различными функциями, а гибель некомпетентной субпопуляции позволяет выживать бактериальному консорциуму в целом [19, 20].

Следует отметить, что бактерии с инвагинациями клеточной стенки наблюдались как на ранней стадии формирования биопленки (через 24 ч), так и на более поздней (14 суток культивирования).

Дисперсия биопленки является менее изученной стадией жизненного цикла биопленки. Тем не менее известно, что на активное высвобождение биопленочных клеток путем дис-

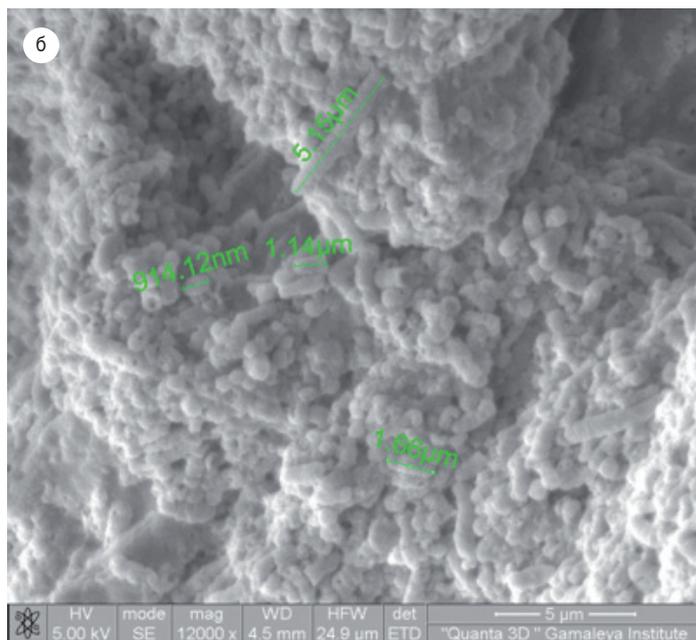
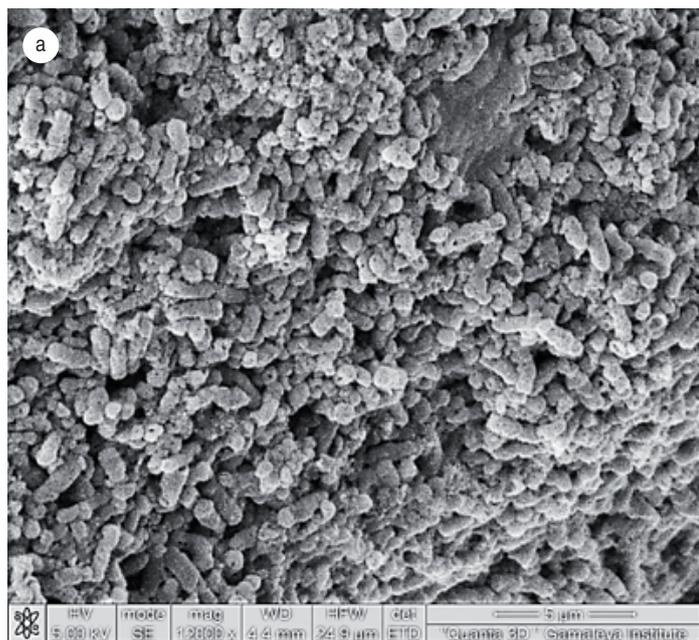


Рис. 11. Поверхность сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 12\ 000$ .

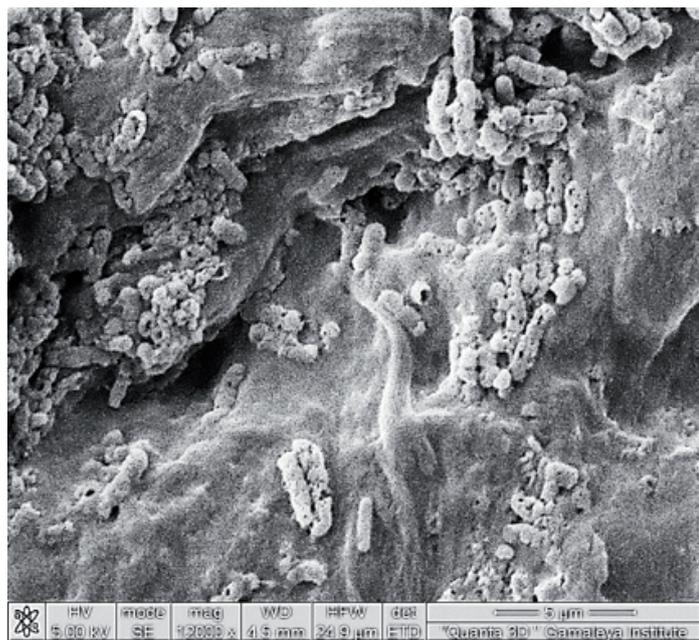


Рис. 12. СЭМ поверхности образца сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч,  $\times 12\ 000$ .

персии влияют факторы окружающей среды, включая колебания температуры и pH, накопление отходов, наличие питательных веществ и кислорода, межклеточную передачу сигнальных молекул [7]. Биопленки могут также высвобождать клетки в окружающую среду за счет сдвиговых сил, и этот пассивный процесс часто называют отслоением [21].

Клиническое значение микробов, растущих в виде биопленок, заключается в том, что их труднее выделить из клинических образцов, они физиологически гораздо более устойчивы к воздействию антибиотиков и дезинфицирующих средств [22]. Поэтому антибиотикотерапия, основанная на тестировании чувствительности планктонных бактерий, может быть связана с неудачным лечением или рецидивом инфекции [23]. Хотя в условиях разработанной нами систе-

мы можно сравнить влияние антимикробных препаратов на обе формы существования бактерий.

Некоторые микробы в биопленках могут быть жизнеспособными, но не культивируемыми при использовании обычных сред [24].

В этом случае предлагают использовать независимые от культивирования методы [25, 26]. Поскольку культуральный метод или не связанные с ним способы (например, полимеразная цепная реакция) не могут различать биопленочные и планктонные микроорганизмы, идентификация биопленок основана на микроскопическом обнаружении микробных агрегатов, расположенных в матрице.

Считается, что в идеале результаты микроскопии и культивирования должны быть количественными или полуколичественными, а микробы должны быть идентифицированы до уровня видов, чтобы помочь отличить примеси от нормальной микробиоты и инфекционных микроорганизмов, независимо от того, были ли они ранее связаны с биопленочными инфекциями [6].

Ранее мы показали, что во всех образцах, выделенных из этих атеросклеротических бляшек, идентифицирован генетический материал хотя бы одного вида микробиоты, включая ДНК пародонтопатогенов, некоторых возбудителей зоокомиальных инфекций, вирусов семейства *Herpesviridae* и *Candida* spp. [11, 27, 28]. С помощью метода культивирования в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях мы смогли подтвердить разнообразие жизнеспособной микробиоты в атеросклеротических бляшках. После их пересева на плотные питательные среды и из отпечатков фрагментов атеросклеротических бляшек были выделены и идентифицированы 4 штамма пародонтопатогенов (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*), 21 штамм возбудителей гнойно-воспалительных инфекций (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis/aecium*, *Enterobacter* spp.) и 6 штаммов *Candida* spp., всего 31 штамм [10, 29]. Известно, что некото-

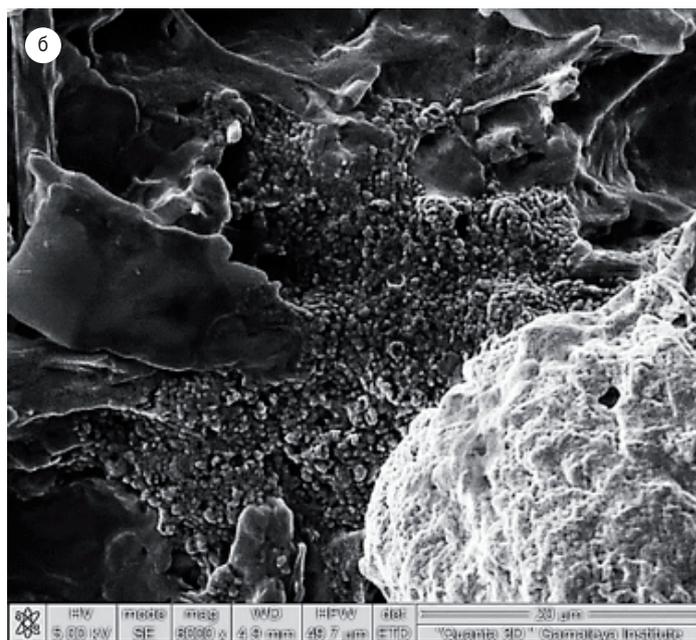
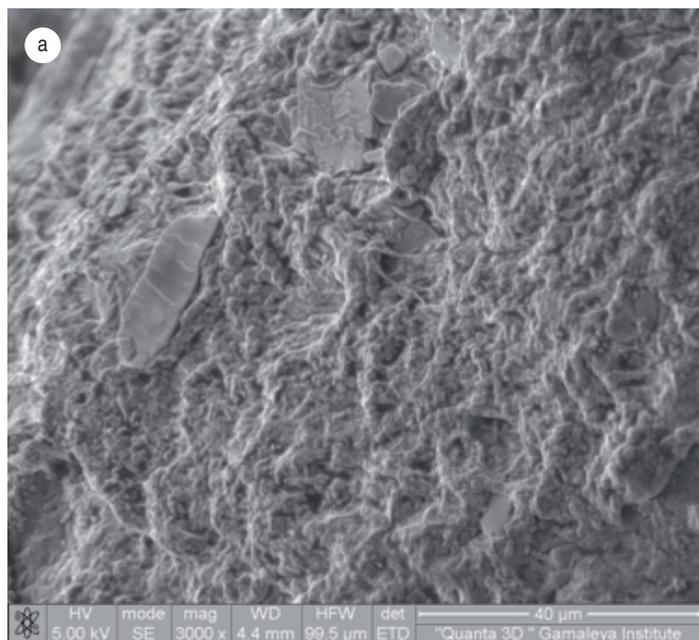


Рис. 13. Биопленка на поверхности сосуда №5, время культивирования 14 суток, ×6000.

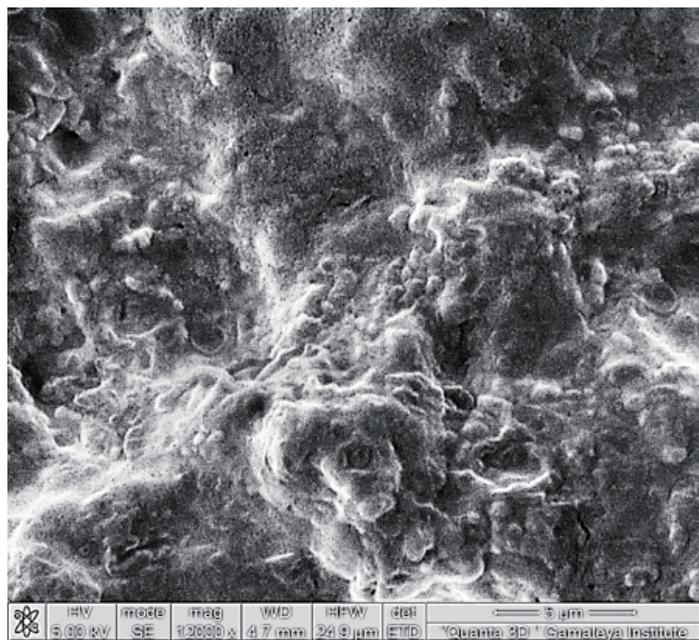


Рис. 14. Участок биопленки на поверхности сосуда №5 с выраженной экзоцеллюлярной мантией, время культивирования 14 суток, ×12 000.

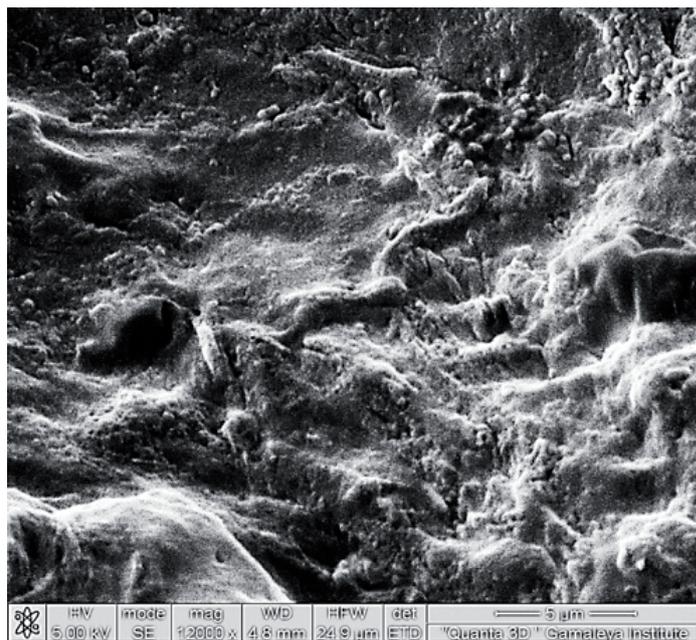


Рис. 15. Биопленка на поверхности сосуда №5 в участке бляшки белого цвета, время культивирования 14 суток, ×12 000.

рые представители нормальной микрофлоры могут образовывать биопленки (например, *Staphylococcus epidermidis* на внутривенных линиях или на ортопедическом аллопластическом материале) [4, 26].

Отметим, что Lanter V.B. et al. (2014) обнаружили в 15 образцах сонных артерий с атеросклеротическими бляшками последовательности рПНК зубактерий [9]. В каждой из 5 сонных артерий, исследованных более глубоко, имелись от 10 до 18 уникальных маркеров генов 16S рПНК, что указывало на колонизацию различными типами бактерий. С помощью зондов PNA-FISH (флуоресцентно-меченных специфических генов 16S рПНК зубактерий) были выявлены структуры, указывающие на присутствие микроколоний,

каждая из которых была ограничена по площади и содержала от нескольких десятков до нескольких сотен обнаруживаемых зондов-мишеней, в среднем диаметром около 1 мкм, указывающих на наличие бактерий. Авторы считают, что бактерии, обнаруженные в артериях, вероятно, вызывают образование бляшек. В частности, они предполагают, что бактерии существуют в виде биопленок, а внезапное распространение этих биопленок в планктонные формы бактерий является основной причиной острых сердечно-сосудистых заболеваний.

Snow D.E. et al. (2016), используя флуоресцентную микроскопию и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) для выявления компонентов биопленки, показали, что присут-

стии биопленок в сильно склерозированных артериях может быть важным фактором в прогрессировании хронических воспалительных атеросклеротических процессов в ампутированных конечностях пациентов с диабетическими язвами стоп и сосудистыми заболеваниями [30]. По их мнению, хотя наличие бактериальных структур биопленки в атеросклеротической бляшке не доказывает, что именно биопленка является непосредственной причиной атеросклероза, она может способствовать постоянному ассоциированному с ней воспалению.

### Заключение

Таким образом, моделируя биопленки на биотических поверхностях в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях, с использованием СЭМ и молекулярных методов можно изучить фенотип биопленок более подробно и полно, что позволяет детализировать понимание патофизиологии инфекционных процессов в кровеносных сосудах и атеросклеротических бляшках с участием микробного фактора. Применение метода культивирования микроорганизмов в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях подтверждает разнообразие жизнеспособной микробиоты в атеросклеротических бляшках, включающей представителей факультативно- и облигатно-анаэробных видов бактерий, а также дрожжевых грибов рода *Candida*. Обнаружение в составе микробных биопленок атеросклеротических бляшек облигатно-анаэробных видов бактерий, в свою очередь, является аргументом в пользу исключения заноса микробов из воздушной среды операционной.

### 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

- Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, Møller A, Bjarsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65:127-45. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x
- Ramage G, Robertson SN, Williams C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:114-20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023
- Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens.* 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
- Bjarsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:791-808. DOI: 10.1038/nrd4000
- Окулич ВК, Плотников ФВ, Кабанова АА. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе. *Иммунология, аллергология, инфектология.* 2012;4:70-82.
- Hoiby N, Bjarsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al, for the ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB) and Consulting External Expert Werner Zimmerli ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections, 2014. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:S1-S25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024
- Bjarsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sorensen SR, Moser C, Kuhl M, et al. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol.* 2013 Sep;21(9):466-74. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002
- Шарифуллина ДМ, Васильева ПМ, Яковлева ТИ, Николаева ЕГ, Поздеев ОК, Ложкин АП, Хайруллин РН. Микробный пейзаж биоплатов атеросклеротических бляшек. *Казанский медицинский журнал.* 2015;96(6):979-82. DOI: 10.17750/KMJ2015-979
- Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio.* 2014;5(3):e01206-14. DOI: 10.1128/mBio.01206-14. PMID: 24917599
- Витович МВ. Выделение и идентификация биопленкообразующих микробов в атеросклеротических бляшках. *Материалы V Национального конгресса бактериологов.* М.: Династия; 2019, с. 22-23.
- Tsarev VN, Nikolaeva EN, Vitovich MV. Identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases. *Process Management and Scientific Developments.* Birmingham, UK. 2020;90-7. DOI: 10.34660/INF.2020.4.52976
- Ипполитов ЕВ, Царёв ВН, Арутюнов СД, Степанов АГ, Подпорин МС, Шишова ВГ, Малазония ТТ. Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*. Патент RU №2619169, действ. с 20.11.2015.
- Диденко ЛВ, Автандилов ГА, Смирнова ТА, Шевлягина НВ, Царёв ВН, Лебедеко ИЮ, и др. Исследование процессов колонизации и персистенции микроорганизмов на искусственных материалах медицинского назначения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015;5:64-9.
- Ипполитов ЕВ, Диденко ЛВ, Царёв ВН. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015;60(12):59-64.
- Ramos JN, Souza C, Faria YV, da Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):672. DOI: 10.1186/s12879-019-4294-7
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
- Окулич ВК, Кабанова АА, Плотников ФВ. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. *Витебск: ВГМУ;* 2017, 300 с.
- Popp PF, Mascher T. Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *J Mol Biol.* 2019;431(23):4656-69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.024
- Durand PM, Barreto Filho MM, Michod RE. Cell Death in Evolutionary Transitions in Individuality. *Yale J Biol Med.* 2019;92(4):651-62. PMID: 31866780. PMCID: PMC6913816
- Ikryannikova LN, Kurbatov LK, Soond SM, Zamyatnin AA Jr. Harnessing the Potential of Killers and Altruists within the Microbial Community: A Possible Alternative to Antibiotic Therapy? *Antibiotics.* 2019;8:230. DOI: 10.3390/antibiotics8040230
- França A, Carvalhais V, Vilanova M, Pier GB, Cerca N. Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express.* 2016;6(1):23. DOI: 10.1186/s13568-016-0197-9
- Otto M. Staphylococcal Infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 2013;64:175-88. DOI: 10.1146/annurev-med-042711-140023

23. Hoiby N, Bjarsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:322-32. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
24. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam JS, Singh PK. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep*. 2014;6:293-300. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.019
25. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1812-17. DOI: 10.1093/jac/dkt086
26. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:259-61. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03893.x
27. Алшибая ММ, Витович МВ, Николаева ЕН, Царёв ВН. Пародонтопатогенная микрофлора в атеросклеротических бляшках у пациента с сердечно-сосудистым заболеванием. Атеросклероз и дислипидемии. 2019;4(37):64-8. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0007
28. Николаева ЕН, Алшибая ММ, Витович МВ. Оценка распространенности инфекционных агентов в атеросклеротических бляшках у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Российская стоматология. 2017;10(1):102-3.
29. Царёв ВН, Николаева ЕН, Витович МВ, Подпорин МС. Биопленкообразующие бактерии в атеросклеротических бляшках у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и хроническим пародонтитом. Клиническая стоматология. 2020;2:38-43. DOI: 10.37988/1811-153X\_2020\_2\_40
30. Snow DE, Everett J, Mayer G, Cox SB, Miller B, Rumbaugh K, Wolcott RA, Wolcott RD. The presence of biofilm structures in atherosclerotic plaques of arteries from legs amputated as a complication of diabetic foot ulcers. *J Wound Care*. 2016;25(2):16-22. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.Sup2.S16
9. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio*. 2014;5(3):e01206-14. DOI: 10.1128/mBio.01206-14. PMID: 24917599
10. Vitovich MV. Isolation and identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques. *Proceedings of the V National Congress of Bacteriologists*. Moscow: Dynasty, 2019, pp. 22-23. (In Russian).
11. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Vitovich MV. Identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases. *Process Management and Scientific Developments*. Birmingham, UK. 2020;90-7. DOI: 10.34660/INF.2020.4.52976
12. Ippolitov EV, Tsarev VN, Arutyunov SD, Stepanov AG, Podporin MS, Shishova VG, Malazoniya TT. Method for forming of combined periodontal anaerobic bacteria biofilm under fluid conditions *in vitro*. Patent RU No 2619169, effective from 20.11.2015. (In Russian).
13. Didenko LV, Avtandilov GA, Smirnova TA, Shevlagina NV, Tsarev VN, Lebedenko IYu, et al. Study of colonization processes and persistence of microorganisms in artificial materials for medical use. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2015;5:64-9. (In Russian).
14. Ippolitov EV, Didenko LV, Tsarev VN. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, *Candida*-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika)*. 2015;60(12):59-64. (In Russian).
15. Ramos JN, Souza C, Faria YV, da Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):672. DOI: 10.1186/s12879-019-4294-7
16. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
17. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov PV. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. Vitebsk, 2017, 300 p. (In Russian).
18. Popp PF, Mascher T. Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *J Mol Biol*. 2019;431(23):4656-69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.024
19. Durand PM, Barreto Filho MM, Michod RE. Cell Death in Evolutionary Transitions in Individuality. *Yale J Biol Med*. 2019;92(4):651-62. PMID: 31866780. PMCID: PMC6913816
20. Ikryannikova LN, Kurbatov LK, Soond SM, Zamyatnin AA Jr. Harnessing the Potential of Killers and Altruists within the Microbial Community: A Possible Alternative to Antibiotic Therapy? *Antibiotics*. 2019;8:230. DOI: 10.3390/antibiotics8040230
21. França A, Carvalhais V, Vilanova M, Pier GB, Cerca N. Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express*. 2016;6(1):23. DOI: 10.1186/s13568-016-0197-9
22. Otto M. Staphylococcal Infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med*. 2013;64:175-88. DOI: 10.1146/annurev-med-042711-140023
23. Hoiby N, Bjarsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:322-32. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
24. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam JS, Singh PK. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep*. 2014;6:293-300. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.019
25. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1812-17. DOI: 10.1093/jac/dkt086
26. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central

## References

1. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, Møller A, Bjarsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65:127-45. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x
2. Ramage G, Robertson SN, Williams C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43:114-20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023
3. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
4. Bjarsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:791-808. DOI: 10.1038/nrd4000
5. Okulich VK, Plotnikov PV, Kabanova AA. Biofilm's role in the pathogenesis of infectious process at the present stage. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2012;4:70-82. (In Russian).
6. Hoiby N, Bjarsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al, for the ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB) and Consulting External Expert Werner Zimmerli ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections, 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:S1-S25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024
7. Bjarsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sorensen SR, Moser C, Kuhl M, et al. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol*. 2013 Sep;21(9):466-74. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002
8. Sharifullina DM, Vasil'eva RM, Yakovleva TI, Nikolaeva EG, Pozdeev OK, Lozhkin AP, Khayrullin RN. Microbial landscape of atherosclerotic plaques biopsy samples. *Kazan Medical Journal*. 2015;96(6):979-82. DOI: 10.17750/KMJ2015-979 (In Russian).

- venous catheters negative on standard microbiological assays. Clin Microbiol Infect. 2012;18:259-61. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03893.x
27. Alshibaya MM, Vitovich MV, Nikolaeva EN, Tsarev VN. Parodontopathogenic microflora in atherosclerotic plaque in patient with cardiovascular disease. The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias. 2019;4(37):64-8. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0007 (In Russian).
28. Nikolaeva EN, Alshibaya MM, Vitovich MV. Estimation of the prevalence of infectious agents in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular disease. Russian Stomatology (Rossiiskaya stomatologiya). 2017;10(1):102-3. (In Russian).
29. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Vitovich MV, Podporin MS. Biofilm-forming bacteria in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases and chronic periodontitis. Clinical Dentistry. 2020;2:38-43. DOI: 10.37988/1811-153X\_2020\_2\_40 (In Russian).
30. Snow DE, Everett J, Mayer G, Cox SB, Miller B, Rumbaugh K, Wolcott RA, Wolcott RD. The presence of biofilm structures in atherosclerotic plaques of arteries from legs amputated as a complication of diabetic foot ulcers. J Wound Care. 2016;25(2):16-22. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.Sup2.S16

#### Информация об авторах:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»  
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: nikola777@rambler.ru

Витович Марина Вадимовна, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»  
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: vitovich.m.v@gmail.com

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»  
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»  
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: ippo@bk.ru

#### Information about authors:

Viktor N. Tsarev, MD, PhD, DSc, head of department by microbiology, virology and immunology professor, director of Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: nikola777@rambler.ru

Marina V. Vitovich, postgraduate student of the department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: vitovich.m.v@gmail.com

Mikhail S. Podporin, junior researcher of molecular biology research laboratory, Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Evgeniy V. Ippolitov, MD, PhD, DSc, professor, senior researcher of molecular biology research laboratory, Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700

## НОВОСТИ НАУКИ

### Четверть бактериальных патогенов может распространять устойчивость к антибиотикам непосредственно среди себе подобных

Биомедицинские инженеры Университета Дьюка продемонстрировали, что по крайней мере 25% устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий способных распространять свою устойчивость непосредственно среди других бактерий. Исследование показывает, что использование антибиотиков не оказывает значительного влияния на скорость, с которой бактерии обмениваются генами, ответственными за устойчивость.

Исследователи использовали новый высокопроизводительный метод измерения скорости, с которой бактерии обмениваются пакетами ДНК, дающими устойчивость. Скорость и способность автоматизировать большую часть процесса могут дать новое понимание того, какие факторы влияют на скорость передачи. Это может помочь врачам замедлить или даже обратить вспять распространение устойчивости у определенных человеческих патогенов.



*One quarter of bacterial pathogens can spread antibiotic resistance directly to peers [Electronic resource].  
URL: <https://phys.org/news/2020-01-quarter-bacterial-pathogens-antibiotic-resistance.html>*

# Характеристика чувствительности к антибиотикам штаммов *Shigella sonnei*, выделенных от пациентов из очагов шигеллезов, возникших в Северо-Западном федеральном округе в 2018 году

М.А.Макарова<sup>1,2</sup>, З.Н.Матвеева<sup>1</sup>, Л.А.Кафтырева<sup>1,2</sup>, Е.А.Михайлова<sup>3</sup>, М.А.Кузакова<sup>3</sup>, О.И.Лаушкина<sup>3</sup>, Т.М.Кузьмина<sup>3</sup>, О.Е.Самсонова<sup>4</sup>, Л.И.Алексеевко<sup>5</sup>, И.А.Постнова<sup>5</sup>, Л.М.Фёдорова<sup>5</sup>

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

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

<sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>4</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области в Лужском районе», Луга, Российская Федерация;

<sup>5</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области в Гатчинском районе», Гатчина, Российская Федерация

Работа посвящена изучению чувствительности к антибиотикам 42 штаммов *Shigella sonnei*, выделенных от пациентов, вовлеченных в три вспышки, возникшие в Северо-Западном федеральном округе России в 2018 г. Штаммы принадлежали к одному биовару IIg, были резистентны к тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу. Штаммы характеризовались чувствительностью к нитрофурантоину, ципрофлоксацину, но были резистентны к налидиксовой кислоте. К аминогликозидам (гентамицину, тобрамицину и амикацину) штаммы проявляли чувствительность, к стрептомицину – резистентность. Чувствительность к азитромицину сохранялась у всех штаммов, МПК составляла 8 мг/л. Один очаг был вызван штаммом *S. sonnei*, дополнительно резистентным к хлорамфениколу и цефалоспорином, продуцирующим ESBL.

**Ключевые слова:** *Shigella sonnei* биовар IIg, резистентность к антибиотикам, ESBL

**Для цитирования:** Макарова М.А., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А., Михайлова Е.А., Кузакова М.А., Лаушкина О.И., Кузьмина Т.М., Самсонова О.Е., Алексеевко Л.И., Постнова И.А., Фёдорова Л.М. Характеристика чувствительности к антибиотикам штаммов *Shigella sonnei*, выделенных от пациентов из очагов шигеллезов, возникших в Северо-Западном федеральном округе в 2018 году. Бактериология. 2020; 5(2): 18–23. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-18-23

## Characteristics of susceptibility to antibiotics of *Shigella sonnei* caused three outbreaks in the North-Western region of Russia in 2018

М.А.Makarova<sup>1,2</sup>, Z.N.Matveeva<sup>1</sup>, L.A.Kaftyreva<sup>1,2</sup>, E.A.Mikhailova<sup>3</sup>, M.A.Kuzakova<sup>3</sup>, O.I.Laushkina<sup>3</sup>, T.M.Kuzmina<sup>3</sup>, O.E.Samsonova<sup>4</sup>, L.I.Alekseenko<sup>5</sup>, I.A.Postnova<sup>5</sup>, L.M.Fedorova<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

<sup>3</sup>Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation;

<sup>4</sup>Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region in the Luga District, Luga, Russian Federation;

<sup>5</sup>Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region in the Gatchinsky District, Gatchina, Russian Federation

### Для корреспонденции:

Макарова Мария Александровна, старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

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

Телефон: (812) 232-4843

E-mail: makmaria@mail.ru

Статья поступила 05.08.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Maria A. Makarova, senior researcher, laboratory of identification of pathogens infections, Saint-Petersburg Pasteur Institute

Address: 14 Mira str., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation

Phone: (812) 232-4843

E-mail: makmaria@mail.ru

The article was received 05.08.2020, accepted for publication 15.09.2020

The work is devoted to the study of susceptibility to antibiotics of 42 strains of *Shigella sonnei* isolated from patients involved in three food-borne outbreaks that occurred in the North-Western region of Russia in 2018. All strains belonged to biovar IIg, showed resistance to tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole. The strains were susceptible to nitrofurantoin, ciprofloxacin, but were resistant to nalidixic acid, were susceptible to aminoglycosides (gentamycin, tobramycin, and amikacin), and resistance to streptomycin. All strains were susceptible to azithromycin (MIC 8 mg/L). One outbreak was caused by *S. sonnei* additionally resistant to chloramphenicol and cephalosporins, producing ESBLs.

**Key word:** *Shigella sonnei* biovar IIg, antibiotic resistance, outbreaks, ESBL

**For citation:** Makarova M.A., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A., Mikhailova E.A., Kuzakova M.A., Laushkina O.I., Kuzmina T.M., Samsonova O.E., Alekseenko L.I., Postnova I.A., Fedorova L.M. Characteristics of susceptibility to antibiotics of *Shigella sonnei* caused three outbreaks in the North-Western region of Russia in 2018. *Bacteriology*. 2020; 5(2): 18–23. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-18-23

Общее число случаев шигеллеза в мире ежегодно оценивается в 165 млн, при этом более 100 млн случаев регистрируются в странах Африки. Летальность в эпидемиологический период может достигать 7%, общее число умерших ежегодно составляет около 1 млн человек, причем 70% всех случаев заболевания и летальных исходов приходится на группу детей младше 5 лет [1].

В РФ в последние десять лет (2010–2019 гг.) отмечена тенденция к снижению уровня заболеваемости бактериальной дизентерией на 30%. Средний многолетний показатель равнялся 8,41 на 100 тыс. населения. В 2019 г. доля шигеллеза Флекснера составила 60,8%, на шигеллез Зонне приходилось 39,2%. В целом по стране были зарегистрированы 17 (в 2018 г. – 25) очагов групповой заболеваемости шигеллезами с 638 (в 2018 г. – 614) пострадавшими. Ведущими факторами, способствующими возникновению очагов групповой заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ), были нарушения требований действующих нормативно-методических документов, в том числе правил личной гигиены персонала пищеблоков. В предыдущие годы в этиологической структуре сохранялся равный вклад *Shigella sonnei* и *Shigella flexneri*. В 2017–2019 гг. преобладали случаи, вызванные *S. flexneri* (около 70%). На фоне практически повсеместного снижения заболеваемости ОКИ, в том числе дизентерией, регистрируются групповые заболевания в дошкольных и школьных учреждениях, стационарах, как правило, с пищевым путем передачи. В общей структуре на долю вспышек ОКИ пищевого характера приходится 75%, водного – 18%, контактно-бытового – 7% [2].

Шигеллы (*Shigella spp.*) – возбудители бактериальной дизентерии (шигеллезов) человека, антропонозного инфекционного заболевания с фекально-оральным механизмом передачи. Источником инфекции является больной острой или хронической формой дизентерии, реконвалесцент или транзитный носитель. Наибольшую опасность представляют больные с легкой и стертой формами дизентерии, работающие в пищевой промышленности, и приравненные к ним декретированные группы населения. Возбудитель обитает в кишечнике, с фекалиями попадает во внешнюю среду. Часто встречается в воде открытых водоемов, пищевых продуктах, на поверхности объектов внешней среды. Пути передачи инфекции различные: пищевой, водный и контактный. Пищевой путь передачи инфекции является ведущим. Факторы передачи – различные пищевые продукты, массивно обсемененные возбудителем.

Бактерии рода *Shigella* – типичные представители семейства *Enterobacteriaceae*, имеют таксономическую близость (один геновид) с *Escherichia coli*, их трудно отличить от непод-

вижных, лактозотрицательных анаэробных диареогенных *E. coli* энтероинвазивной патогруппы (enteroinvasive *E. coli* – EIEC). Согласно современной классификации, род состоит из четырех видов: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*. Каждый из видов, кроме *S. sonnei*, включает несколько серологических вариантов: *S. dysenteriae* – 16 (1–16), *S. flexneri* – 8 (1–6, X и Y) и 11 подсероваров (1a, 1в, 2a, 2в, 3a, 3в, 3с, 4a, 4в, 5a, 5в), *S. boydii* – 19 (1–19). *S. sonnei* серологически не дифференцируют [3, 4].

Шигеллезы широко распространены в мире, особенно в странах с низкой санитарной культурой. Этиологическая роль разных видов *Shigella spp.* неодинакова. Наибольшее значение практически во всех странах, включая Россию, имеют *S. sonnei* и *S. flexneri*. Этиологическое значение отдельных сероваров также неоднозначно: среди *S. dysenteriae* доминируют серовары 2 и 3, *S. boydii* – 4 и 2, *S. flexneri* – подсеровары 2a, 1b. Среди *S. sonnei* преобладают биовары IIe, IIg и Ia.

Контроль пищевых продуктов на загрязненность патогенными микроорганизмами (присутствие или отсутствие бактерий рода *Shigella*) позволяет оценить степень контаминации пищевой продукции и дать оценку эффективности принимаемых мер в целях обеспечения безопасности выпускаемой продукции [5]. Методы проведения микробиологического исследования по обнаружению возбудителей острых кишечных инфекций регламентированы в Государственном стандарте ГОСТ 32010-2013 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*» [6].

В лабораторной практике нередко ошибки при идентификации бактерий рода *Shigella*. Наиболее часто за *Shigella spp.* принимают *E. coli*, *Hafnia spp.*, *Providencia spp.* в связи с общностью некоторых их ферментативных и культуральных свойств. Поэтому целесообразно выделять основные признаки, по совокупности которых можно четко дифференцировать *Shigella spp.* от указанных микроорганизмов (табл. 1). Ряд указанных в таблице реакций характерен для представителей всего рода. Так, все *Shigella spp.* неподвижны, не образуют сероводород, не гидролизуют мочевины, не утилизируют малонат натрия, цитрат в среде Симмонса и D-тартрат, не продуцируют ацетоин в реакции Фогеса–Проскауэра, не синтезируют ферменты фенилаланиндезаминазу, лизиндекарбоксилазу и желатиназу, не вызывают щелочения среды Кристенсена, не ферментируют адонит и инозит, дают положительную реакцию с метиловым красным.

В настоящее время в 50% случаев шигеллезы протекают как острый колит, без примеси крови в испражнениях, который клинически невозможно отличить от диареи, вызванной

Таблица 1. Основные дифференциальные признаки штаммов *Shigella* spp. и сходных с ними микроорганизмов

Тест или субстрат	<i>Shigella</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Hafnia</i> spp.		<i>Providencia</i> spp.
			37°C	22°C	
Лактоза	-, (+)	X	-, (+)	-, (+)	-
Глюкоза (газ)	-, +	+, -	X	+	+, -
Салицин	-	X	X	X	-
Лизиндекарбоксилаза	-	+, -	+	+	-
Цитрат Симмонса	-	-	(+), -	+	+
Цитрат Кристенсена	-	X	+	+	+
Ацетат	-	+, (+)	-, (+)	-, (+)	-, (+)
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	+
Реакция V-P*	-	-	+, -	+	-
Мукат	-	+	-	-	-
Подвижность	-	+, -	X	+	+, -

Реакция: «-» – отрицательная; «+» – положительная реакция; «(+)-» – замедленная; X – переменная; \*Фогес-Проскауэра.

другими патогенными энтеробактериями (*Salmonellae* spp., EIEC, *Campylobacter* spp.) При развитии дизентерийного (колитического) синдрома (частые, малообильные испражнения, содержащие свежую кровь или гной и большое количество слизи; болезненные тенезмы; сильная спастическая боль в животе) пациентам показано назначение antimicrobial препаратов (АМП) [7, 8]. Антибиотикотерапия снижает продолжительность лихорадки и диареи на 1–2 дня, прекращает выделение возбудителя и уменьшает риск передачи его от человека человеку. В настоящее время для лечения дизентерии у детей и взрослых рекомендован пероральный прием ципрофлоксацина или азитромицина, для тяжелых форм или иммунокомпрометированных пациентов – цефтриаксон парентерально. «Старые» АМП, использовавшиеся ранее для лечения (ко-тримоксазол, ампициллин, налидиксовая кислота), практически утратили свое значение в терапии из-за развития устойчивости у большинства штаммов [9].

Современной особенностью энтеробактерий – возбудителей инфекционных заболеваний является глобальное развитие резистентности к АМП. В 2017 г. ВОЗ опубликовала список устойчивых к АМП «приоритетных патогенов» – 12 видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. Включенные возбудители разделены на три группы по потребности в создании новых антибиотиков: 1) крайне приоритетные; 2) высокоприоритетные; 3) среднеприоритетные [10]. К крайне приоритетной группе относят бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, включая карбапенемы и цефалоспорины третьего поколения, представляющие серьезную опасность для пациентов больниц и лечебно-реабилитационных центров и пациентов, для лечения которых требуются медицинские устройства (аппараты для искусственной вентиляции легких, венозные катетеры и др.). В эту группу входят *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и различные виды семейства *Enterobacteriaceae* (включая *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* и *Proteus*). К группе с высоким уровнем приоритетности относят: *Enterococcus faecium*, устойчивые к ванкомицину; *Staphylococcus aureus*, устойчивые к метициллину, умеренно чувствительные или

устойчивые к ванкомицину; *Helicobacter pylori*, устойчивые к кларитромицину; *Campylobacter* spp. и *Salmonellae* spp., устойчивые к фторхинолонам, и *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивые к цефалоспорином. В группу со средним уровнем приоритетности вошли: *Streptococcus pneumoniae*, нечувствительные к пенициллину; *Haemophilus influenzae*, устойчивые к ампициллину, и *Shigella* spp., устойчивые к фторхинолонам.

Цель исследования заключалась в изучении резистентности к АМП штаммов *S. sonnei* – возбудителей трех вспышек, возникших среди населения на территории Северо-Западного федерального округа.

### Материалы и методы

Изучена чувствительность 42 штаммов *S. sonnei*, выделенных от пациентов с диагнозом «шигеллез Зонне» (госпитализированных или получавших медицинскую помощь в амбулаторных условиях) из трех не связанных между собой очагов, к 15 АМП: аминопенициллинам (ампициллин и амоксициллин / клавулановая кислота), цефалоспорином (цефтриаксон), карбапенемам (меропенем), хинолонам (налидиксовая кислота и ципрофлоксацин), аминогликозидам (стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин), тетрациклинам (тетрациклин), нитрофуранам (нитрофурантоин), ко-тримоксазолу, левомицетину и азитромицину. Определение чувствительности к АМП проводили методами диско-диффузионным и градиентной диффузии (азитромицин) согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к antimicrobial препаратам» с использованием дисков производства Oxoid. У штаммов, нечувствительных к бета-лактамам препаратам, изучили продукцию ESBL, в подтверждающем тесте синергизма с двумя дисками [11].

### Результаты и обсуждение

Штаммы *S. sonnei*, выделенные от пациентов из трех очагов ОКИ, принадлежали к одному биовару IIg и характеризовались разными фенотипами резистентности (табл. 2).

Все штаммы были резистентными к тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу. Штаммы характеризовались чувствительностью к нитрофурантоину и ципрофлоксацину, но были резистентны к налидиксовой кислоте. К аминогликозидам (гентамицину, тобрамицину и амикацину) штаммы проявляли чувствительность, к стрептомицину – резистентность. Чувствительность к азитромицину сохранялась у всех штаммов, МПК составляла 8 мг/л. Штаммы, выделенные из очага №3, отличались резистентностью к хлорамфениколу и цефалоспорином (цефтриаксону) за счет продукции ESBL (тест с клавулановой кислотой положительный). В двух других очагах (№1 и №2) штаммы имели одинаковые фенотипы резистентности.

Выделение резистентных к антибиотикам штаммов *S. sonnei* от пациентов с диареей отмечено во многих странах. Исследования, проведенные в Испании, показали, что в 1995–2010 гг. наблюдалась тенденция уменьшения частоты выделения *Shigella* spp. при диареех путешественников, возвратившихся из тропических регионов мира, на этом фоне

Таблица 2. Чувствительность/резистентность к АМП штаммов *S. sonnei*

Антимикробный препарат	Очаг ОКИ		
	№1	№2	№3
Чувствительность/ резистентность к антибиотикам			
ампициллин	S	S	R
амоксиклав	S	S	S
цефтриаксон	S	S	R
меропенем	S	S	S
налидиксовая кислота	R	R	R
ципрофлоксацин	S	S	S
тетрациклин	R	R	R
левомицетин	S	S	R
нитрофурантоин	S	S	S
ко-тримоксазол	R	R	R
стрептомицин	R	R	R
гентамицин	S	S	S
тобрамицин	S	S	S
амикацин	S	S	S
азитромицин	S	S	S

S – чувствительный; R – резистентный.

отмечался рост резистентности к АМП штаммов, выделенных в разные годы. В 1995–2000 гг. популяция *Shigella* spp. характеризовалась высоким уровнем устойчивости к тетрациклину (48%), ко-тримоксазолу (75,5%), ампициллину (45,5%) и низким уровнем устойчивости к ципрофлоксацину (2,1%), азитромицину (3,9%) и фуразолидону (8,4%). К 2010 г. достоверно снизился уровень резистентности к ампициллину, амоксиклаву и хлорамфениколу (в 2,2–3,0 раза), а устойчивость к налидиксовой кислоте и тетрациклину выросла почти в 5 раз [12].

В США, по данным национальной системы надзора за антибиотикорезистентностью бактерий (NARMS), более 90,0% штаммов *Shigella* устойчивы к одному и более классам АМП. Наиболее высокие показатели устойчивости отмечены к «старым» препаратам: стрептомицину (92,3%; 100% – *S. sonnei*, 80% – *S. flexneri*), ампициллину (46,2%; 33,3% – *S. sonnei*, 66,7% – *S. flexneri*), ко-тримоксазолу (82,1%; 91,7% – *S. sonnei*, 66,7% – *S. flexneri*) и тетрациклину (74,4%; 62,5% – *S. sonnei*, 93,3% – *S. flexneri*). Фенотип множественной устойчивости, как правило, отмечается к «старым» АМП. Устойчивость к АМП, рекомендованным в настоящее время для лечения дизентерии, в последние пять лет значительно выросла и достигла 30,8% для азитромицина (20,8% – *S. sonnei*; 46,7% – *S. flexneri*), 10,3% для цефтриаксона (12,5% – *S. sonnei*; 6,7% – *S. flexneri*), 12,8% для ципрофлоксацина (20,8% – *S. sonnei*), сниженная чувствительность к фторхинолонам отмечена у 23,1% штаммов (29,2% – *S. sonnei*; 13,3% – *S. flexneri*) [13].

В Южной Азии сформировался клон *S. sonnei*, устойчивый к ципрофлоксацину, который в настоящее время стал международным и распространился в США, Австралию и страны Европы. Устойчивые к азитромицину штаммы также распространены глобально, особенно среди ВИЧ-

инфицированных пациентов. В азиатских странах появились штаммы, устойчивые к цефалоспорином расширенного спектра, что значительно ограничивает возможности эффективной этиотропной терапии [9].

В странах ЕС в 2017 г. было зарегистрировано 6337 подтвержденных случаев дизентерии (показатель заболеваемости 1,7 на 100 тыс.). Наибольшие показатели отмечены в группе детей до 5 лет (4,3 на 100 тыс.). 42,9% случаев были связаны с путешествием, главным образом в Индию и Марокко. В последние годы возникли несколько вспышек, связанных с употреблением импортированных свежих овощей и трав. В странах ЕС отмечено распространение полирезистентного клона *S. flexneri* подсеровара 3a с устойчивостью высокого уровня к азитромицину. Распространение этого клона происходит контактным путем. В развитых странах передача дизентерии контактным путем среди мужчин становится более распространенной, чем передача вследствие нарушения санитарно-гигиенических норм [14].

### 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

- Puzari M, Sharma M, Chetia P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: a matter of concern. J Infect Public Health. 2018;11(4):451-454. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.09.025
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2019, 268 с.
- Голубева ИВ. Энтеробактерии. Руководство для врачей. И.В.Голубева, В.А.Килессо, В.И.Покровский (ред.). М.: Медицина; 1985, 325 с.
- Руководство по медицинской микробиологии. Под ред. А.С.Лабинской. М.: Медицина; 2013, 1080 с.
- Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. Введ. 2013-07-01.
- ГОСТ 32010-2013. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*. Межгосударственный стандарт. Введ. 2014-07-01. М.: Стандартинформ; 2013, 19 с.
- Шигеллез у взрослых: клинические рекомендации. М.: Национальное научное общество инфекционистов; 2014, 79 с.
- Лобзин ЮВ, Якушин СБ, Захаренко СМ. Практические рекомендации по ведению пациентов с инфекционной диареей. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001;2(3):163-182.
- Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. Lancet. 2018;391:801-812. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33296-8
- ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения), 2017. Список бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

11. Клинические рекомендации «Определение чувствительности к антимикробным препаратам», версия 2018-03. Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>
12. Pons MJ, Gomes C, Martínez-Puchol S, Ruiz L, Mensa L, Vila J, Gascón J, Ruiz J. Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995–2010): A retrospective analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(5):315-319. DOI: 10.1016/j.tmaid.2013.06.010
13. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta, Georgia: U.S [Электронный ресурс]. Department of Health and Human Services. CDC. 2019. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/narmsnow>
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Shigellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm [Электронный ресурс]. ECDC. 2020. Режим доступа: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2017\\_shigellosis.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017_shigellosis.pdf)

## References

1. Puzari M, Sharma M, Chetia P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: a matter of concern. *J Infect Public Health.* 2018;11(4):451-454. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.09.025
2. State of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018: state report. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2019, 268 p. (In Russian).
3. Golubeva IV. Enterobakterii [Enterobacteria]. I.V.Golubeva, V.A.Killeso, V.I.Pokrovskii (eds.). Moscow: "Meditsina" Publ.; 1985, 325 p. (In Russian).
4. Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii [Medical Microbiology]. Edited by A.S.Labinskaya. Moscow: "Meditsina" Publ.; 2013, 1080 p. (In Russian).
5. Technical regulations of the Customs Union. On food safety: TR CU 021/2011. (In Russian).
6. GOST 32010-2013. Food products. Method of detecting bacteria of the genus *Shigella*. Interstate standard. Moscow: "Standartinform" Publ.; 2013, 19 p. (In Russian).
7. Shigellosis in adults: clinical recommendations. Moscow: National Scientific Society of Infectious Diseases; 2014, 79 p. (In Russian).
8. Lobzin YuV, Yakushin SB, Zakharenko SM. Prakticheskie rekomendatsii po vedeniyu patsientov s infektsionnoy diareei. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika).* 2001;2(3):163-182. (In Russian).
9. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. *Lancet.* 2018;391:801-812. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33296-8
10. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (In Russian).
11. Clinical guidelines "Definition of sensitivity to antimicrobial agents," version 2018-03. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> (In Russian).
12. Pons MJ, Gomes C, Martínez-Puchol S, Ruiz L, Mensa L, Vila J, Gascón J, Ruiz J. Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995–2010): A retrospective analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(5):315-319. DOI: 10.1016/j.tmaid.2013.06.010
13. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta, Georgia: U.S Department of Health and Human Services. CDC. 2019. Available at: <https://www.cdc.gov/narmsnow>
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Shigellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm [Электронный ресурс]. ECDC. 2020. Available at: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2017\\_shigellosis.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017_shigellosis.pdf)

## Информация об авторах:

Матвеева Зоя Николаевна, ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 232-4843  
 E-mail: kaffidia@mail.ru

Кафтырева Лидия Алексеевна, заведующая лабораторией кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 232-4843  
 E-mail: kaffidia@mail.ru

Михайлова Елена Анатольевна, начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ленинградской области  
 Адрес: 192029, Санкт-Петербург, ул. Ольминского, 27  
 Телефон: (812) 365-0026  
 E-mail: lenoblzdrav47@yandex.ru

Кузакова Мила Александровна, врач-бактериолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области»  
 Адрес: 192029, Санкт-Петербург, ул. Ольминского, 27  
 Телефон: (812) 448-0520  
 E-mail: baklab@cge47.ru

Лаушкина Оксана Ивановна, врач-бактериолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области»  
 Адрес: 192029, Санкт-Петербург, ул. Ольминского, 27  
 Телефон: (812) 448-0520  
 E-mail: baklab@cge47.ru

Кузьмина Татьяна Михайловна, заведующая микробиологической лабораторией, врач-бактериолог, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области»  
 Адрес: 192029, Санкт-Петербург, ул. Ольминского, 27  
 Телефон: (812) 448-0520  
 E-mail: baklab@cge47.ru

Самсонова Ольга Евгеньевна, врач-бактериолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области в Лужском районе»  
 Адрес: Ленинградская область, г. Луга, Ленинградское шоссе, 13  
 Телефон (81372) 2-21-21

Алексеевко Людмила Ивановна, врач-бактериолог, заведующая бактериологической лабораторией ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области в Гатчинском районе»  
 Адрес: 188306, Ленинградская область, г. Гатчина, ул. Карла Маркса, 44а  
 Телефон: (81371) 9-84-95  
 E-mail: baklabgtn@mail.ru

Постнова Инна Анатольевна, врач-бактериолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области в Гатчинском районе»  
 Адрес: 188306, Ленинградская область, г. Гатчина, ул. Карла Маркса, 44а  
 Телефон: (81371) 9-84-95  
 E-mail: baklabgtn@mail.ru

Фёдорова Людмила Михайловна, врач-бактериолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области в Гатчинском районе»  
 Адрес: 188306, Ленинградская область, г. Гатчина, ул. Карла Маркса, 44а  
 Телефон: (81371) 9-84-95  
 E-mail: baklabgtn@mail.ru

## Information about authors:

Zoya N. Matveeva, leading researcher, laboratory of enteric infections, Saint-Petersburg Pasteur Institute  
 Address: 14 Mira str., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 232-4843  
 E-mail: kaffidia@mail.ru

Lydia A. Kaftyreva, head of enteric infections Saint-Petersburg Pasteur Institute,  
 Address: 14 Mira str., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 232-4843  
 E-mail: kaffidia@mail.ru

Elena A. Mikhaylova, head of the epidemiological surveillance Department of the Rosпотребнадзор for the Leningrad region  
 Address: 27 Olminsky str., Saint-Petersburg, 192029, Russian Federation  
 Phone: (812) 365-0026  
 E-mail: lenoblzdrav47@yandex.ru

Mila A. Kuzakova, bacteriologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
 Address: 27 Olminsky str., Saint-Petersburg, 192029, Russian Federation  
 Phone: (812) 448-0520  
 E-mail: baklab@cge47.ru

Oksana I. Laushkina bacteriologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
Address: 27 Olminsky str., Saint-Petersburg, 192029, Russian Federation  
Phone: (812) 448-0520  
E-mail: baklab@cge47.ru

Tatyana M. Kuzmina, head microbiological laboratory, bacteriologist of Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
Address: 27 Olminsky str., Saint-Petersburg, 192029, Russian Federation  
Phone: (812) 448-0520  
E-mail: baklab@cge47.ru

Olga E. Samsonova, bacteriologist of Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
Address: 13 Leningradskoe Hwy., Luga, Russian Federation  
Phone: (81372) 221-21

Ludmila I. Alekseenko, head microbiological laboratory, bacteriologist of Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
Address: 44 Karl Marx str., Gatchina, 188306, Russian Federation  
Phone: (81371) 9-84-95  
E-mail: baklabgtn@mail.ru

Inna A. Postnova, bacteriologist of Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
Address: 44 Karl Marx str., Gatchina, 188306, Russian Federation  
Phone: (81371) 9-84-95  
E-mail: baklabgtn@mail.ru

Ludmila M. Fedorova, bacteriologist of Center for Hygiene and Epidemiology in the Leningrad Region  
Address: 44 Karl Marx str., Gatchina, 188306, Russian Federation  
Phone: (81371) 9-84-95  
E-mail: baklabgtn@mail.ru

## НОВОСТИ НАУКИ

### Аутоиммунитет может объяснить, почему важная иммунная система отсутствует у многих бактерий

CRISPR-Cas – это иммунная система, которая защищает бактерии от заражения бактериофагами. Система работает путем использования небольшого фрагмента вирусной ДНК для уничтожения соответствующих участков генома вируса во время будущей инфекции. Таргетинг CRISPR-Cas нарушает геном вируса, что означает, что новые копии вируса не могут быть созданы.

Ранее группы Westra и van Houte из Института окружающей среды и устойчивого развития Университета Ренгун Campus в Корнуолле показали, что CRISPR-Cas может обеспечить превосходную защиту от «литических» фагов, размножающихся внутри клетки-хозяина, приводящих к разрыву бактериальной клетки и высвобождению большого количества вирусных частиц (10.1016/j.cub.2015.01.065, 10.1038/nature.17436).

Однако для вирусов характерно следовать «лизогенному» образу жизни, то есть они могут интегрироваться в геном хозяина и становиться бездействующими до тех пор, пока триггер (часто связанный со стрессом хозяина или сигналами от других фагов) не заставит их снова войти в литический режим.

Ведущие авторы настоящего исследования, Клэр Ролли и Энн Шеваллеро, оба работающие в группе Вестра, объясняют, что иммунная система не способна устранять лизогенные фаги и часто приводит к повреждению аутоиммунитета хозяина против фага.

Этот тип аутоиммунитета был вызван системой CRISPR-Cas, нацеленной на вирусную ДНК, которая была включена в собственный геном хозяина, что привело к гибели клеток хозяина и высвобождению вируса.

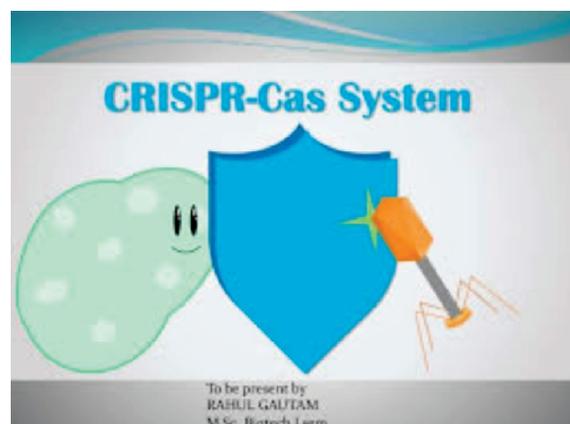
Установлено, что бактериальные клетки, которые потеряли систему CRISPR-Cas из своего генома, избежали повреждения, вызванного аутоиммунным нацеливанием, выжили и размножились.

Анти-CRISPR-белки, которые являются ингибиторами, продуцируемыми фагом для противодействия иммунному ответу CRISPR-Cas хозяина и, как считалось ранее, приносящие пользу только фагу-продуценту, также обеспечивают защиту для хозяина. Отключение иммунной системы хозяина блокирует аутоиммунитет и предотвращает гибель бактериальной клетки.

Бактериальный аутоиммунитет вызывается несовершенным сопоставлением «спейсеров» – последовательностей, которые направляют систему CRISPR-Cas к вирусной ДНК.

Авторы показали, что эти несовершенные совпадения с фагами часто встречаются в природе и поэтому этот аутоиммунный эффект, вероятно, является распространенным следствием наличия системы CRISPR-Cas.

Важно, что это может помочь объяснить, почему CRISPR-Cas присутствует только в 40% бактериальных геномов и часто приобретает и теряется из близкородственных штаммов.



*Rollie C. et al. Targeting of temperate phages drives loss of type I CRISPR-Cas systems. Nature. 2020.*

# Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях

Ю.А.Скоморина<sup>1</sup>, А.А.Кремлева<sup>1</sup>, Л.Ш.Ахметова<sup>1</sup>, Т.А.Подольская<sup>1</sup>, А.П.Шепелин<sup>2</sup>, О.В.Полосенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория», Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Статья посвящена сравнительным исследованиям современных дифференциально-диагностических питательных сред для эффективного культивирования и идентификации *Escherichia coli*. Проведена оценка качества питательных сред по биологическим показателям в соответствии с их назначением. Особое внимание уделено дифференциально-диагностическим средам нового поколения. Установлено, что испытываемые среды обладают высокой производительностью и ингибирующими свойствами. Современные питательные среды отечественных производителей не уступают по заявленным производителями характеристикам. При условии проведения валидационных процедур ветеринарные лаборатории вправе использовать современные питательные среды, не установленные нормативными документами.  
**Ключевые слова:** питательные среды, эшерихии, производительность, селективность и специфичность

**Для цитирования:** Скоморина Ю.А., Кремлева А.А., Ахметова Л.Ш., Подольская Т.А., Шепелин А.П., Полосенко О.В. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях. Бактериология. 2020; 5(2): 24–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-24-32

## Comparative evaluation of nutrient media of *Escherichia coli* isolating for using in veterinary laboratories

Yu.A.Skomorina<sup>1</sup>, A.A.Kremleva<sup>1</sup>, L.Sh.Akhmetova<sup>1</sup>, T.V.Podolskaya<sup>1</sup>, A.P.Shepelin<sup>2</sup>, O.V.Polosenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The article is focus on comparative studies of modern differential diagnostic nutrient media for effective cultivation and identification of *Escherichia coli*. The assessment of the quality of media by biological properties was carried out in accordance with their purpose. Special attention is paid to the new generation of differential diagnostic nutrient media. It was found that the tested media have high productivity and inhibitory properties. New culture media of inland producers are not inferior in terms of the characteristics declared by the manufacturers. In case of methods validation the veterinarian laboratory will be able to use new nutrient media.  
**Key words:** nutrient media, *Escherichia*, productivity, selectivity and specificity

**For citation:** Skomorina Yu.A., Kremleva A.A., Akhmetova L.Sh., Podolskaya T.V., Shepelin A.P., Polosenko O.V. Comparative evaluation of nutrient media of *Escherichia coli* isolating for using in veterinary laboratories. Bacteriology. 2020; 5(2): 24–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-24-32

**E***scherichia coli* (эшерихии) – преимущественные бактерии нормальной факультативно-анаэробной микрофлоры кишечника человека и животных, но ряд сероваров могут быть возбудителями острых инфекционных болезней животных всех видов [1].

Наряду с тем, что эшерихии являются возбудителями инфекционных болезней, эти синантропные бактерии относят-

ся еще и к основным санитарно-показательным микроорганизмам. В настоящее время кишечная палочка принята в качестве показателя фекального загрязнения объектов внешней среды, в том числе пищевых продуктов и кормов. Так, при обнаружении *E. coli* делают заключение о наличии фекального загрязнения и возможном присутствии патогенных видов.

### Для корреспонденции:

Скоморина Юлия Александровна, заместитель руководителя / заведующий отделом бактериологии ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»

Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23

Телефон: (495) 700-0137

E-mail: yskomorina@inbox.ru

Статья поступила 30.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Yulia A. Skomorina, deputy head / head of the department of bacteriology of the Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory

Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation

Phone: (495) 700-0137

E-mail: yskomorina@inbox.ru

The article was received 30.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

Согласно действующим на территории Российской Федерации нормативным документам по исследованию кормов и кормовых добавок, кишечная палочка является одним из главных показателей контроля качества и безопасности. Среди бактериальных болезней животных *E. coli* является одним из основных возбудителей инфекционных болезней животных, в частности молодняка.

На территории Российской Федерации действуют следующие ветеринарные нормативные документы (НД) по выделению кишечной палочки из кормов из патологического материала животных: «Правила бактериологического исследования кормов», 1975 г. [2], ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения» [3] и «Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», 2000 [4].

В лабораторных условиях для определения наличия или отсутствия *E. coli* (в том числе и патогенных) в кормах и патологическом материале при бактериологическом исследовании основным этапом является посев на питательные среды. Культуральный метод с применением питательных сред является основой исследовательской работы микробиологов. Надежность питательной среды зависит от качества основных ингредиентов среды, правильности рецептуры, качества методики приготовления, степени отсутствия микробного заражения, а также от надлежащих условий упаковки и хранения. Выбор питательных сред и их производителей также напрямую влияет на результат работы микробиолога и определяет ее успех.

В вышеуказанных нормативных документах предусмотрено использование таких питательных сред, как агар Эндо и Левина. Однако в настоящее время существует широкий выбор питательных сред как российского, так и зарубежного производства, характеризующихся высокой чувствительностью и производительностью, а также обладающих хорошими дифференцирующими, ростовыми и ингибирующими свойствами.

В современной лабораторной практике широкое применение имеют хромогенные среды, позволяющие не только обнаруживать, но и одновременно идентифицировать микроорганизмы благодаря компонентам, входящим в состав питательной среды. Хромогенные питательные среды позволяют выявить специфические ферменты у разных микроорганизмов. Для обнаружения такого фермента и, соответственно, идентификации микроорганизма в состав среды вводят определенный субстрат – вещество, при расщеплении которого этим ферментом образуются окрашенные продукты. Идентификация микроорганизмов возможна уже на этапе первичного посева, что позволяет сократить время исследования.

Актуальность совершенствования методов исследования материала для выделения *E. coli* в ветеринарной практике связана с появлением новых питательных сред. Применение современных сред в ветеринарной практике затруднительно из-за отсутствия их в действующих НД. Однако для использования питательных сред, не предусмотренных НД, в лаборатории есть возможность проведения валидационного процесса [5]. При проведении валидации лаборатория подтверждает то, что новые используемые питательные среды не уступают по характеристикам питательным средам, заявленным в нормативных документах.

**Цель исследования** – сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *E. coli* отечественных и зарубежных производителей.

## Материалы и методы

В работе использованы питательные среды, предназначенные для выделения *E. coli*, различных производителей: среда Левина (HiMedia) [6], лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ) [7], хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) [8], дезоксихолат-лактозный агар (HiMedia), лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью (Merck), желчный глюкозный агар с фиолетовым красным (Bio-Rad) [9], агар Макконки-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ), сорбитол *E. coli* O157:H7 (ФБУН ГНЦ ПМБ), среды Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Merck, HiMedia, Conda); триптон-соевый агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) [6–10]. Все питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению.

Сравнительные исследования питательных сред проводили по значимым биологическим показателям: производительность, специфичность и селективность согласно требованиям ГОСТ 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды» [11].

- Производительность питательной среды (PR) – это степень роста целевого микроорганизма на питательной среде при определенных условиях.

- Селективность питательной среды – это степень ингибирования нецелевого микроорганизма на/в селективной питательной среде при определенных условиях.

- Специфичность питательной среды – это демонстрация при определенных условиях того, что нецелевые микроорганизмы не проявляют те же визуальные характеристики, что целевые микроорганизмы [11, 12].

Для контроля качества питательных сред по микробиологическим показателям использовали целевые (для выявления и подсчета) и нецелевые (не демонстрируют признаков, характерных для целевого микроорганизма) тест-штаммы микроорганизмов, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: *E. coli* ATCC 25922; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79; *Klebsiella pneumonia* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 и изоляты энтеробактерий, выделенные из кормов: *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* и *Proteus*.

Исследования проводили в соответствии с требованиями действующих нормативных документов [2–4].

Биохимическую идентификацию изолятов энтеробактерий проводили с помощью стрипов API 20E.

Используя стерильный 0,9%-й раствор натрия хлорида, готовили взвесь культуры, оптическая плотность которой соответствовала 10 ед. по стандартному образцу мутности (СОС-42-28-85). Из полученной суспензии готовили 10-кратные разведения ( $10^{-2}$ – $10^{-8}$ ) путем последовательного переноса 0,5 мл взвеси культуры в пробирки с 4,5 мл стерильного 0,9%-го раствора натрия хлорида. Посевная доза составила 120 микробных клеток. Учет результатов проводили

через 18–20 ч инкубации посевов при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  путем визуального определения количества, размера и характера роста колоний.

### Результаты и обсуждение

Назначение и основные характеристики используемых в работе питательных сред представлены в табл. 1.

Анализируя данные, можно заявить, что на сегодняшний день существует довольно широкий спектр питательных сред различных производителей для выделения энтеробактерий и *E. coli*. Питательные среды сконструированы таким образом, чтобы использовать ростовые особенности энтеробактерий для их выявления по способности конвертировать тот или иной субстрат.

Одним из требований, предъявляемым к питательным средам, является морфологическая оценка роста целевых штаммов и полное или частичное ингибирование роста нецелевых штаммов. На всех испытуемых питательных средах были изучены культурально-морфологические свойства и эксплуатационные критерии с использованием тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922; *E. aerogenes* ATCC 13048 NCTC

10006; *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79; *K. pneumonia* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603.

Для определения селективности испытуемых питательных сред качественным методом использовали тест-штаммы *E. faecalis* ATCC 19433 и *S. aureus* ATCC 25923.

Посев тест-штаммов осуществлялся на среды согласно требуемому разведению по ГОСТ 11133-2016 (*E. coli* по 0,1 мл из разведения  $10^{-6}$  и *S. aureus* / *E. faecalis* по 0,1 мл из разведения  $10^{-4}$ ). Посевы инкубировались при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18–24 ч.

Результаты биологического контроля качества питательных сред различных производителей представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что на питательных средах, согласно заявленным характеристикам, отмечался выраженный рост целевого тест-штамма *E. coli*. Практически на всех исследуемых средах полностью подавлен рост грамположительных нецелевых тест-штаммов *E. faecalis* и *S. aureus*, за исключением среды Левина, на которой *S. aureus* показал слабо выраженный рост в виде бесцветных колоний.

Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на различных питательных средах представлен на рис. 1–12.

Таблица 1. Характеристика питательных сред для выделения *E. coli*

№ п/п	Наименование среды	Назначение	Характеристики среды
1.	Среда Левина	Для выделения и дифференциации патогенных и условно патогенных энтеробактерий, а также для выделения стафилококков	Метиленовый синий и эозин в определенной степени подавляют рост грамположительных микроорганизмов. Данные красители служат в качестве дифференцирующих индикаторов ферментации лактозы
2.	Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	Для обнаружения и учета <i>E. coli</i> и колиформных бактерий	Ингибирующие свойства придает гептадецилсульфат натрия (Тергитол-7), подавляющий роение протей и рост большинства грамположительных микроорганизмов
3.	Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	Для одновременного определения колиформ и <i>E. coli</i>	Наличие в среде пептонов, пирувата, сорбитола и фосфатного буфера обеспечивает быстрый рост колоний, даже поврежденных клеток колиформных бактерий
4.	Дезоксихолат-лактозный агар	Для выделения и подсчета колиформных бактерий	Оптимальные концентрации дезоксихолата натрия и цитрата натрия подавляют рост грамположительных бактерий. Лактоза помогает дифференцировать кишечные бактерии
5.	Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью	Для обнаружения и учета колиформных бактерий, включая <i>E. coli</i>	Кристаллический фиолетовый и соли желчных кислот подавляют рост большинства грамположительных сопутствующих бактерий
6.	Желчный глюкозный агар	Для детектирования и подсчета энтеробактерий	Одновременное присутствие кристаллического фиолетового и солей желчи; среда ингибирует грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии
7.	Агар Макконки-ГРМ	Для обнаружения и выделения колиформных бактерий и кишечных патогенов	Желчные соли, кристаллический фиолетовый, входящие в состав среды, значительно подавляют рост грамположительной микрофлоры
8.	Среда сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	Для выделения и дифференциации <i>E. coli</i> O157:H7 и других энтеробактерий по признаку ферментации сорбита	Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает питательные потребности для роста, дифференциации по признаку ферментации сорбита и ингибции отдельных видов микроорганизмов
9.	Среда Эндо (Conda)	Для выделения колиформ и других кишечных микроорганизмов	Продуцирование ацетальдегида лактозо-ферментирующими организмами, такими как <i>E. coli</i> , приводит к образованию характерных красных колоний и красной окружающей зоны вследствие реакции ацетальдегида с сульфитом натрия в присутствии фуксина
10.	Агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Для выделения энтеробактерий	Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает питательные потребности для роста, дифференциации и ингибции отдельных видов микроорганизмов
11.	Среда Эндо (Merck)	Для выявления <i>E. coli</i> и колиформных бактерий	Сульфат натрия и фуксин подавляют рост грамположительных бактерий
12.	Среда Эндо (HiMedia)	Для выделения энтеробактерий	Среда содержит пептон, который обеспечивает азот, углерод, витамины и минералы, необходимые для роста бактерий. Сульфит натрия и основной фуксин делают среду селективной, подавляя грамположительные микроорганизмы

№ п/п	Наименование среды	Диаметр и морфология колоний <i>E. coli</i>	Результаты биологического контроля		
			<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	
1.	Среда Левина	0,5–1,9 мм	Темно-фиолетовые колонии с зеленым металлическим блеском	Наличие роста в виде бесцветных колоний	Отсутствие роста
2.	Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	0,8–2,2 мм	Колонии оранжевого цвета с желтой зоной вокруг	Отсутствие роста	Отсутствие роста
3.	Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	1,7–2,9 мм	Темно-синие и фиолетовые колонии	Отсутствие роста	Отсутствие роста
4.	Дезоксихолат-лактозный агар	0,9–3,0 мм	Розовые с преципитатом вокруг	Отсутствие роста	Отсутствие роста
5.	Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью VRBL	1,0–2,0 мм	Красные колонии, окруженные красноватой зоной преципитации	Отсутствие роста	Отсутствие роста
6.	Желчный глюкозный агар VRBG	2,2–3,5 мм	Розово-красные колонии	Отсутствие роста	Отсутствие роста
7.	Агар Макконки-ГРМ	0,6–2,8 мм	Красные колонии	Отсутствие роста	Отсутствие роста
8.	Среда сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	1,5–2,5 мм	Малиновые колонии со слабо выраженным металлическим блеском или без него	Отсутствие роста	Отсутствие роста
9.	Среда Эндо (Condo)	0,5–2,0 мм	Красные колонии с металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста
10.	Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	2,0–2,5 мм	Малиновые колонии с металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста
11.	Среда Эндо (Merck)	1,2–1,4 мм	Малиновые колонии с зеленоватым металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста
12.	Среда Эндо (HiMedia)	0,8–1,2 мм	Красные колонии с металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста

Наименование питательной среды	Номер чашки					Коэффициент производительности
	1	2	3	4	5	
ТСА	115	116	133	147	93	контроль посевной дозы микроорганизма
Агар Макконки-ГРМ	87	104	103	86	101	0,79
Среда Левина	104	93	92	139	112	0,89
Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	88	94	93	89	94	0,76
Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	86	85	97	99	86	0,75
Дезоксихолат-лактозный агар	91	83	61	57	43	0,55
Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью	69	60	47	63	60	0,50
Желчный глюкозный агар	57	72	76	69	77	0,58
Эндо (HiMedia)	101	107	107	128	110	0,92
Эндо (Merck)	73	67	79	78	66	0,60
Сорбитол-агар	121	122	88	101	99	0,88
Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	121	107	114	102	91	0,88
Эндо (Condo)	97	98	105	106	113	0,86

Все дифференциально-диагностические среды, представленные на рис. 1–12, обеспечивают рост *E. coli*. Морфология, размер и количество колоний соответствуют заявленным производителями характеристикам.

Определение производительности питательных сред проводили следующим образом: в чашки с испытуемыми средами засеивали по 0,1 мл суспензии *E. coli* с концентрацией  $10^2$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Параллельно осуществлялся контроль посевной дозы тест-штамма микроорганизма путем высева на плотную неселективную питательную среду триптон-соевый агар ТСА (ФБУН ГНЦ ПМБ) (контроль) (табл. 3).

После инкубации посевов в термостате в течение 18–24 ч при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  проводили визуальный контроль и количественный подсчет выросших колоний. Все эксперименты проводили в пяти повторностях.

Для каждой селективной питательной среды был определен коэффициент производительности ( $P_R$ ), который вычисляли по формуле:

$$PR = \frac{N_s}{N_o},$$

где  $N_s$  – общее количество колоний, полученных на питательной среде, подвергнутой испытанию (количество колоний в чашках);

$N_o$  – общее количество колоний, полученных на определенной контрольной питательной среде, в одной или нескольких чашках.

Результаты по определению производительности питательных сред представлены в табл. 3 и на рис. 13. В ходе испытаний питательных сред для выделения и идентификации

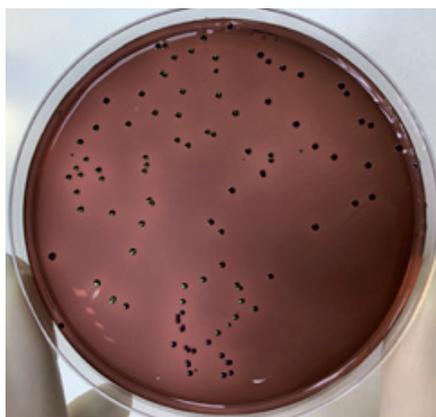


Рис. 1. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Левина.

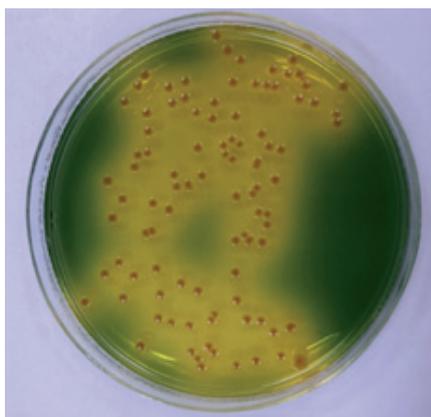


Рис. 2. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7.

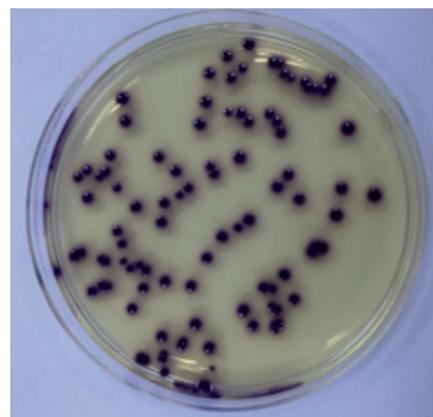


Рис. 3. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Chromocult Coliform.

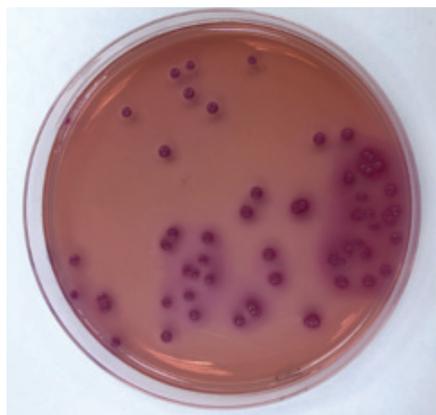


Рис. 4. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на дезоксихолат-лактозном агаре.



Рис. 5. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде VRBL.

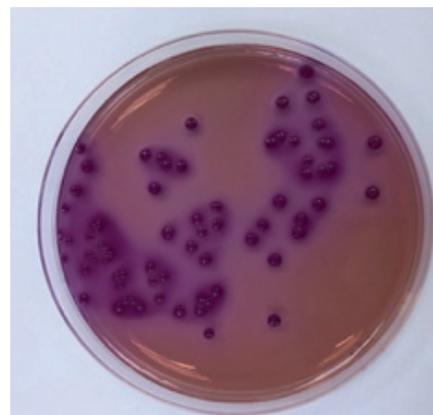


Рис. 6. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде VRBG.

ции энтеробактерий наименее продуктивной средой при посеве контрольного штамма *E. coli* оказались: дезоксихолат-лактозный агар, лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью, желчный глюкозный агар, так как при посевной концентрации тест-штамма *E. coli* – 120 КОЕ/см<sup>3</sup> – количество выросших колоний составило всего 57–91 КОЕ.

Коэффициент производительности целевых микроорганизмов на селективных средах должен быть не менее 0,5 и не более 1,4 [11]. По результатам исследований видно, что все среды имели коэффициент производительности  $\geq 0,5$ . Самый высокий коэффициент производительности PR был по средам Левина, Эндо, Сорбитол-агару. При посевной концентрации 120 КОЕ/см<sup>3</sup> тест-штамма *E. coli* на указанных средах количество выросших колоний соответствовало значению на контрольной среде, что свидетельствует о высокой чувствительности испытуемых питательных сред и сопоставимости результатов.

Дифференциально-диагностические питательные среды, используемые для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, могут иметь разные дифференцирующие свойства. На ряде сред проведение дифференциации *E. coli* от прочих энтеробактерий крайне затруднительно, поэтому на следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ специфичности испытуемых питательных сред (табл. 4).

Специфичность испытуемых питательных сред определяли с использованием тест-штаммов: *E. aerogenes* ATCC 13048 NCTC 10006; *S. enterica* subsp. *enterica* serovar

*Typhimurium* 79; *K. pneumonia* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603 из разведения 10-4.

В результате проведенного анализа специфичности питательных сред для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий было установлено, что дезоксихолат-лактозный агар, агар Макконки-ГПМ, лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью, желчный глюкозный агар проявляют слабовыраженное окрашивание колоний, что приводит к сомнительным результатам дифференциации и необходимости использования дополнительных тестов.

Хромогенный агар для *E. coli* и колиформных бактерий, среды Эндо разных производителей, среда Левина, лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 обеспечивали четкую дифференциацию штаммов *E. coli* от других представителей группы кишечной палочки и были выбраны для дальнейших испытаний.

Следующим этапом работы явился анализ специфичности плотных идентификационных сред при посеве изолятов микроорганизмов, выделенных из кормов животного происхождения, с целью выбора оптимальных питательных сред для проведения исследований в ветеринарных лабораториях.

За период с 01.04.2020 по 31.04.2020 исследовалось 114 проб кормов животного происхождения, выделено 28 культур энтеробактерий. В ходе биохимической идентификации микроорганизмов энтеробактерий, проведенной с помощью стрипов API 20E, выделенные культуры изолятов были определены как *E. coli* (8), *Salmonella* spp., (4), *Proteus mirabilis* (2), *E. aerogenes* (11), *K. pneumoniae* (3).



Рис. 7. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Макконки-ГРМ.

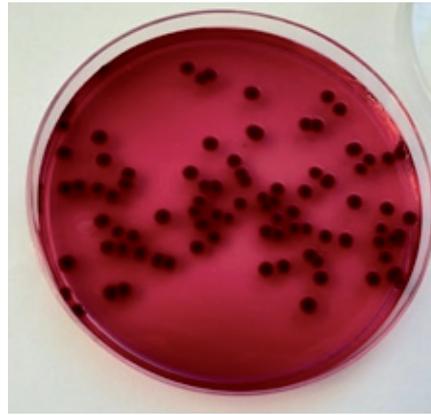


Рис. 8. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде сорбитол *E. coli* O157:H7.



Рис. 9. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (Conda) (после 48 ч инкубации).

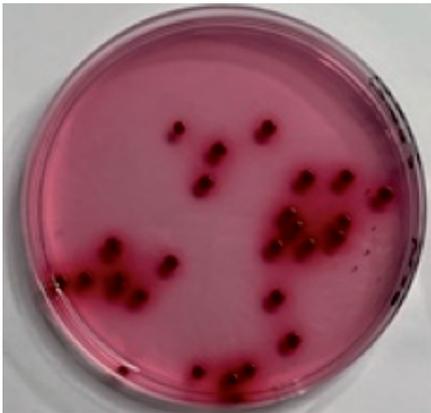


Рис. 10. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ).

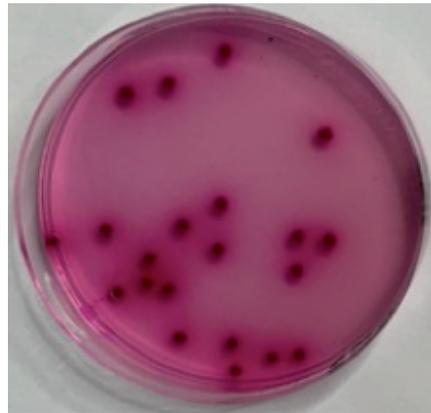


Рис. 11. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (Merck).

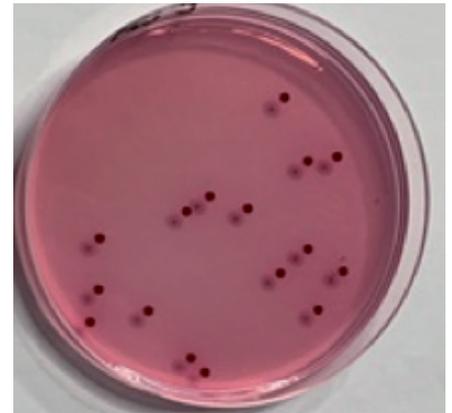


Рис. 12. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (HiMedia).

В дальнейшем для оценки специфичности сред использовали ассоциацию из выделенных изолятов: *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* (табл. 5).

Следует отметить, что четкую дифференциацию колоний энтеробактерий обеспечивали питательные среды: лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ), хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) (рис. 14–17). При проведении сравнительных испытаний питательных сред Эндо производителей ФГБУН ГНЦ ПМБ и HiMedia оказалось, что только питательная среда Эндо ГРМ обеспечивала рост выделенных из кормов изолятов *E. coli* с металлическим блеском, что является дополнительным диагностическим признаком при выделении эшерихий. Следует отметить, что при посеве ассоциации микроорганизмов *E. coli* и *Proteus* на средах Эндо превалирующим был рост протей, что затрудняло дифференциацию из-за его способности к роению.

Таким образом, результаты сравнительных испытаний плотных идентификационных сред для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий разных производителей на музейных тест-штаммах и штаммах, выделенных из кормов, показали, что питательные среды лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (Оболенск) и хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) в ряде случаев превосходят по показателям специфичности и обеспечивают четкую дифференциацию энтеробактерий.

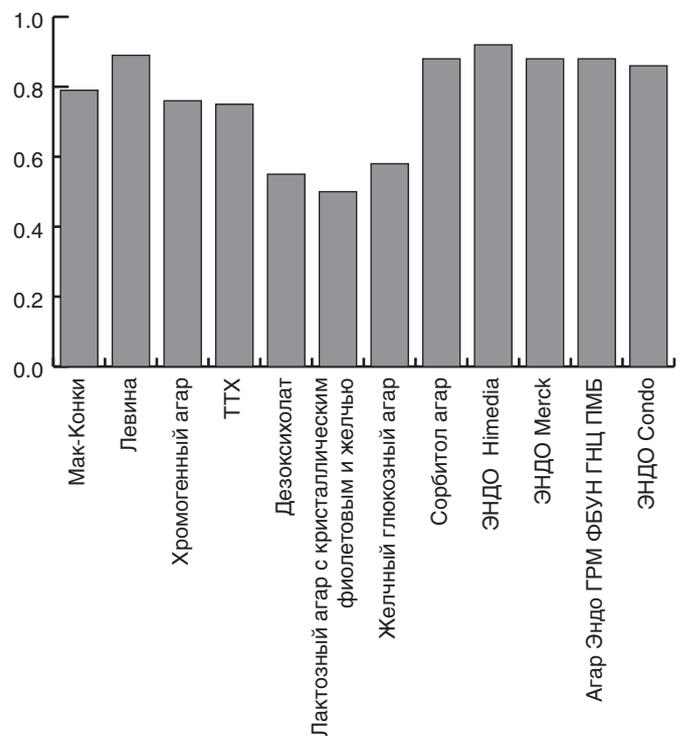


Рис. 13. Коэффициенты производительности питательных сред для выделения энтеробактерий.

**Таблица 4. Специфичность питательных сред для выделения *E. coli***

№ п/п	Наименование среды	Характер роста некоторых тест-штаммов энтеробактерий			
		<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048; NCTC 10006;	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 79	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
1	Среда Левина	Рост подавлен	Бесцветные колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции синерозового цвета	Темно-фиолетовые колонии с зеленым металлическим блеском
2	Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	Зеленовато-желтого цвета колонии	Колонии красного цвета с синей зоной	Зеленовато-желтого цвета колонии	Колонии оранжевого цвета с желтой зоной вокруг
3	Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	Розово-красного цвета колонии	Бесцветные колонии	Розового цвета колонии	Темно-синие и фиолетовые колонии
4	Дезоксихолат-лактозный агар	Розовые с преципитатом вокруг	Бесцветные колонии	Розовые с преципитатом вокруг	Розовые с преципитатом вокруг
5	Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью	Розового цвета колонии	Бесцветные колонии	Красные колонии, окруженные красноватой зоной преципитации	Красные колонии, окруженные красноватой зоной преципитации
6	Желчный глюкозный агар	Розово-красные колонии	Розово-красные колонии	Розово-красные колонии	Розово-красные колонии
7	Агар Макконки-ГРМ	Красные колонии	Бесцветные колонии	Красные колонии	Красные колонии
8	Среда сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	Нежно-розового цвета колонии	Колонии малинового цвета с металлическим блеском	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Малиновые колонии со слабо выраженным металлическим блеском или без него
9	Среда Эндо (Conda)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Красные колонии с металлическим блеском
10	Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Малиновые колонии с металлическим блеском
11	Среда Эндо (Merck)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Малиновые колонии с зеленоватым металлическим блеском
12	Среда Эндо (HiMedia)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Красные колонии с металлическим блеском

**Таблица 5. Выявляемость патогенных энтеробактерий на питательных средах для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий**

Наименование среды	Ассоциация <i>E. coli</i> и <i>S. enteritidis</i>	Ассоциация <i>E. coli</i> и <i>P. mirabilis</i>	Ассоциация <i>E. coli</i> и <i>K. pneumoniae</i>	Штамм <i>E. coli</i> , выделенный из корма
Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Рост в виде роения колоний бледно-розового цвета	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Красные колонии с металлическим блеском
Среда Эндо (HiMedia)	<i>E. coli</i> и единичные колонии <i>Salmonella</i>	Рост в виде роения колоний бледно-розового цвета, единичные красные колонии без металлического блеска	Красные колонии без металлического блеска	Красные колонии без металлического блеска
Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Proteus</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Колонии оранжевого цвета с желтой зоной вокруг
Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Proteus</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Темно-фиолетовые колонии
Среда Левина	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Proteus</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Темно-фиолетовые колонии с зеленым металлическим блеском

### Выводы

На сегодняшний день существует широкий выбор стандартизованных питательных сред для выделения и идентификации энтеробактерий, отличающиеся по составу и назначению. Существующее разнообразие питательных сред

позволяет выделять *E. coli* и одновременно дифференцировать по морфологическим признакам.

Результаты сравнительных испытаний плотных идентификационных сред для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий разных производителей на музейных тест-штаммах и штаммах, выделенных из кормов, показали,

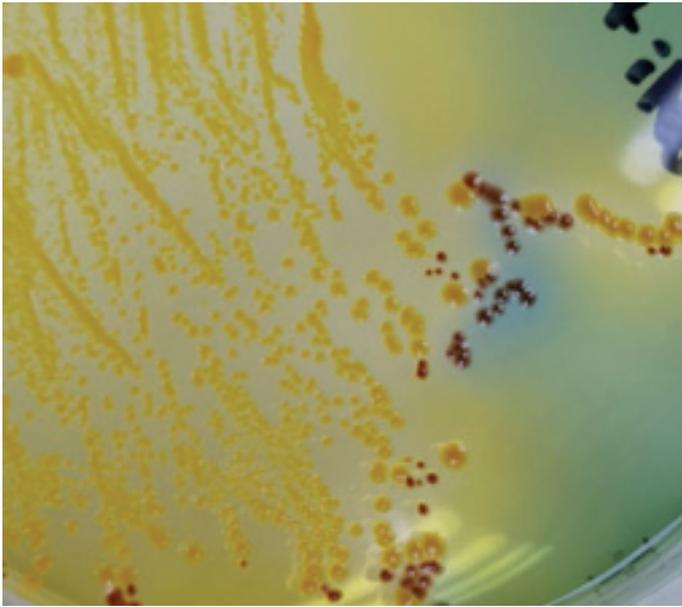


Рис. 14. Рост штамма *E. coli* и *Proteus*, выделенных из кормов, на питательной среде ТТХ-агар.

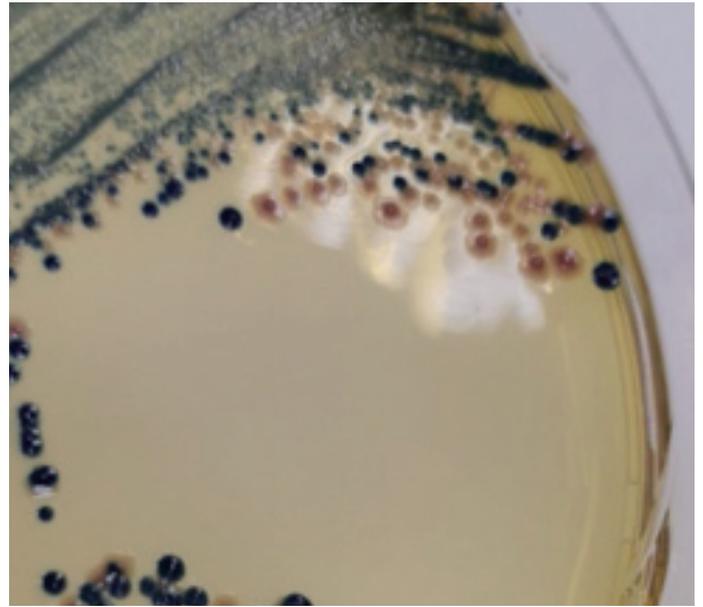


Рис. 15. Рост штамма *E. coli* и *Klebsiella*, выделенных из кормов, на питательной среде хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli*.

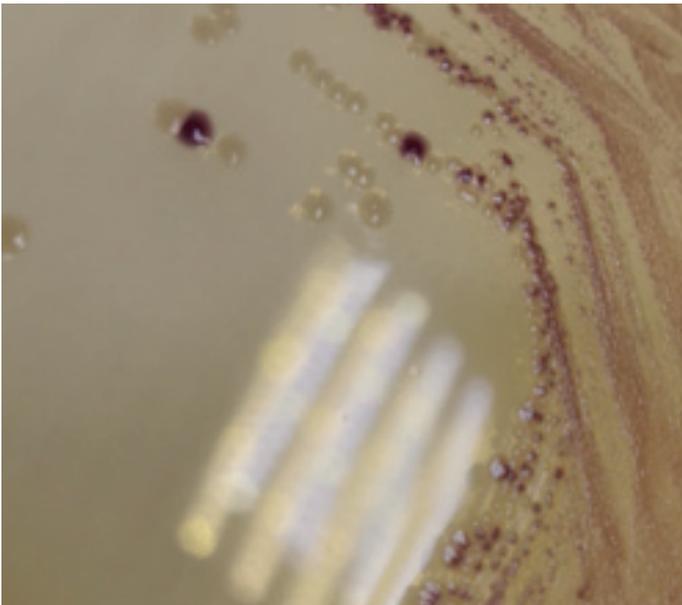


Рис. 16. Рост штамма *E. coli* и *Salmonella*, выделенных из кормов, на питательной среде хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli*.

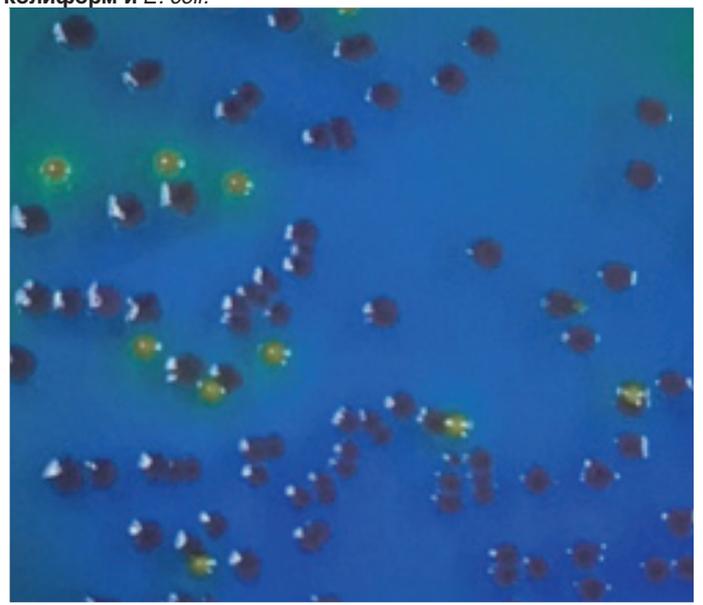


Рис. 17. Рост полевых изолятов *E. coli* и *Salmonella* на питательной среде ТТХ-агар.

что питательные среды лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ) и хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) в ряде случаев превосходят по показателям специфичности такие питательные среды, как дезоксихолат-лактозный агар, агар Макконки-ГРМ, лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью, желчный глюкозный агар, и обеспечивают четкую дифференциацию энтеробактерий.

По ростовым свойствам не уступают, а в ряде случаев превосходят импортные аналоги испытываемые среды отечественного производства – агар Эндо ГРМ и лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7.

Использование совокупности питательных сред для выделения и идентификации энтеробактерий позволит усовершенствовать методы микробиологического анализа кормов,

что существенно повысит результативность бактериологических исследований.

Проведение валидационных процессов методик дает возможность лабораториям проводить исследования на средах, наиболее удобных в использовании, поэтому правильный выбор из такого разнообразия питательных сред будет способствовать повышению объективности получаемых результатов.

#### **Информация о финансировании**

*Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и ФГБУ ЦНМВЛ.*

#### **Financial support**

*The work was performed of the program Rospotrebnadzor and the Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory.*

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература

1. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977 Dec;18(3):775-9. DOI: 10.1128/IAI.18.3.775-779.1977
2. Правила бактериологического исследования кормов. Утверждены Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 10 июня 1975 г.
3. ГОСТ 25311-82. Мука кормовая животного происхождения.
4. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. 2000 г.
5. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
6. HiMedia Laboratories Pvt Limited. A-406. Bhavershwar Plaza, LBS Marg, Mumbai 400 086, India.
7. Диагностические препараты. Каталог продукции. Оболенск: ФБУН ГНЦПМБ.
8. Microbiology Manual. MERCK, LPRO UBA-V.
9. Bio-Rad Laboratories, Inc.
10. Laboratorios CONDA; Calle Forja 9, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid.
11. ГОСТ 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды.
12. Батаева ДС, Панфилова ЕП. Качество питательных сред – залог достоверности и воспроизводимости результатов микробиологических исследований. Все о мясе. 2018;2:41-45. DOI: 10.21323/2071-2499-2018-2-39-43
13. Кремлева А, Скоморина Ю, и др. Оценка распространенности патогенных эшерихий в кормах на территории РФ в 2014–2018 гг. Комбикорма. 2020;3:68-70. DOI: 10.25741/2413-287X-2020-03-4-098
14. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография под ред. д.м.н., проф. А.Ю.Поповой и акад. РАН И.А.Дятлова. М.: Изд. Династия, 2020, с. 368-77.
15. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажержмачева НИ, Ершова МГ, Поletaева ЕД. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(9):557-563. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563
16. Шепелин АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. М.: Изд. Династия, 2017, 231 с.

## References

1. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977 Dec;18(3):775-9. DOI: 10.1128/IAI.18.3.775-779.1977
2. Rules of bacteriological research of feed, 1975. (In Russian).
3. GOST 25311-82. Feeding flour of animal origin. Methods of bacteriological analysis. (In Russian).
4. Guidelines for the bacteriological diagnosis of colibacteriosis (escherichiosis) of animals. 2000. (In Russian).
5. GOST ISO/IEC 17025-2019. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (In Russian).
6. HiMedia Laboratories Pvt Limited. A-406. Bhavershwar Plaza, LBS Marg, Mumbai 400 086, India.
7. Diagnostic drugs. Obolensk: State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. (In Russian).
8. Microbiology Manual. MERCK, LPRO UBA-V.
9. Bio-Rad Laboratories, Inc.
10. Laboratorios CONDA; Calle Forja 9, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid.
11. GOST 11133-2016. Microbiology of food, animal feed, and water. (In Russian).

12. Bataeva DS, Panfilova EP. The quality of the culture mediums is a key to the validity and reproducibility results of microbiological assays. *Vsyo o myase*. 2018;2:41-45. DOI: 10.21323/2071-2499-2018-2-39-43 (In Russian).
13. Kremleva A, Skomorina Yu, et al. Otsenka rasprostranennosti patogennykh esherikhii v kormakh na territorii RF v 2014–2018 gg. *Kombikorma*. 2020;3:68-70. DOI: 10.25741/2413-287X-2020-03-4-098 (In Russian).
14. Mikrobiologicheskii kontrol' kachestva pishchevoi produktsii [Microbiological quality control of food products]. Edited by A.Yu.Popova, I.A.Dyatlov. Moscow: "Dynasty" Publ., 2020, pp. 368-77. (In Russian).
15. 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):557-563. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
16. Shepelin AP, Dyatlov IA. Pitatel'nye sredy dlya enterobakterii [Nutrient media for enterobacteria.]. Moscow: "Dynasty" Publ., 2017, 231 p. (In Russian).

## Информация об авторах:

Кремлева Анна Александровна, научный руководитель ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»  
Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23  
Телефон: (495) 700-0137  
E-mail: viktoriya1409@yandex.ru

Ахметова Лилия Шафиковна, заведующая отделом питательных сред ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»  
Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23  
Телефон: (495) 700-0137  
E-mail: pitatelnie\_sredi@mail.ru

Подольская Татьяна Владимировна, главный специалист ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»  
Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23  
Телефон: (495) 700-0137  
E-mail: pitatelnie\_sredi@mail.ru

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24  
Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: polosenko@obolensk.org

## Information about authors:

Anna A. Kremleva, scientific advisor, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory  
Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation  
Phone: (495) 700-0137  
E-mail: viktoriya1409@yandex.ru

Lilia Sh. Akhmetova, head of nutrient media department, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory  
Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation  
Phone: (495) 700-0137  
E-mail: pitatelnie\_sredi@mail.ru

Tatiana V. Podolskaya, chief specialist, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory  
Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation  
Phone: (495) 700-0137  
E-mail: pitatelnie\_sredi@mail.ru

Anatoly P. Shepelin, MD, PhD, DSc (Biology), deputy director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: 24 Territory «Kvartal A», Obolensk, Serpukhov, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), leading researcher of the microbiological research department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: 24 Territory «Kvartal A», Obolensk, Serpukhov, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: polosenko@obolensk.org

# Результаты мониторинга требований биологической безопасности в ветеринарных лабораториях

Л.В.Чекан, Е.А.Тюрин

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

Рассматривается вопрос оценки результатов, полученных при проведении мониторинга состояния биологической безопасности ветеринарных микробиологических лабораторий различных уровней защиты. Разработан алгоритм проведения мониторинга выполнения требований биологической безопасности: условий организации работы, инженерно-технического обеспечения, охраны здоровья сотрудников лабораторий. Проанализированы нарушения требований биологической безопасности, выявленные во время мониторинга ветеринарных лабораторий различных уровней защиты, сотрудники которых работают с микроорганизмами II–IV групп патогенности (опасности). Предложены мероприятия по улучшению состояния биологической безопасности.

**Ключевые слова:** ветеринарная лаборатория, мониторинг, анализ, биологическая безопасность

**Для цитирования:** Чекан Л.В., Тюрин Е.А. Результаты мониторинга требований биологической безопасности в ветеринарных лабораториях. Бактериология. 2020; 5(2): 33–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-33-37

## Results of monitoring of biological safety requirements in veterinary laboratories

L.V.Chekan, E.A.Tyurin

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

Results from monitoring biological safety in veterinary microbiological laboratories of various levels of protection are under consideration. An algorithm to monitor compliance with biological safety requirements for working conditions, engineering and technical support and protection of the laboratory employee health is adapted. Violations of biological safety requirements identified during the monitoring of veterinary laboratories of various levels of protection, where employees work with microorganisms of Groups II–IV pathogenicity (danger), are studied. Measures to improve the biological safety status are available.

**Keywords:** veterinary laboratory, monitoring, analysis, biological safety

**For citation:** Chekan L.V., Tyurin E.A. Results of monitoring of biological safety requirements in veterinary laboratories. Bacteriology. 2020; 5(2): 33–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-33-37

**В**опросы оценки соблюдения требований биологической безопасности, анализа и оценки выполняемых мероприятий являются важным условием при осуществлении мониторинга лабораторий, работающих с патогенными биологическими агентами (ПБА). Они всегда стоят перед специалистами при оценке и анализе выполнения требований биологической безопасности в той или иной организации во время проведения обследований и мониторинга. Безопасность работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека и животных, относящимися к I–IV группам

патогенности (опасности), бактериальной и вирусной природы обеспечивается соответствующими нормативными требованиями [1–4]. Они определены концепцией биологической безопасности [5] и касаются организации работ с ПБА, строгого соблюдения правил работы с ПБА и материалом, подозрительным на содержание патогенов, наличия инструктивно-методических нормативных документов, состояния лабораторных помещений, разделением их на «чистую» и «заразную» зоны с инженерно-техническим оснащением, приборной и материальной базы, медицинско-

### Для корреспонденции:

Чекан Лариса Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск  
Телефон: (4967) 36-0016  
E-mail: chekan@obolensk.org

Статья поступила 29.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Larisa V. Chekan, senior researcher head of the of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0016  
E-mail: chekan@obolensk.org

The article was received 29.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

го наблюдения за состоянием здоровья сотрудников, обучения и тренировки персонала по вопросам ликвидации последствий аварий во время работы с ПБА [1, 2]. Строгое соблюдение требований и положений биологической безопасности является актуальным и вызывает необходимость проведения регулярного контроля.

Целью работы являлась оценка результатов проведения мониторинга ветеринарных лабораторий разных уровней защиты для выявления нарушений требований биологической безопасности, их анализ, выработка предложений и механизмов для устранения нарушений.

По поручению руководства Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) нами был проведен мониторинг состояния биологической безопасности в лабораториях различных уровней защиты в рамках мероприятий по получению санитарно-эпидемиологического заключения и лицензии на право деятельности с ПБА II–IV групп. Лаборатории, работающие с микроорганизмами бактериальной и вирусной природы, входили в состав учреждений и организаций ветеринарного назначения в субъектах РФ. Эти подразделения, в которых работают с ПБА II–IV групп и биологическими материалами, подозрительными на содержание микроорганизмов II–IV групп патогенности, относят к изолированным и базовым лабораториям соответственно. Такие лаборатории строят с учетом технических заданий и рекомендаций для проектирования зданий и помещений, используемого оборудования, средств индивидуальной защиты (СИЗ), программ подготовки и медицинского обслуживания персонала, мер обеспечения пожарной, охранной и аварийной безопасности для сотрудников и окружающей среды.

Уровень биологической безопасности – это регламентированные требования к организации работ с ПБА I–IV групп (в России) или 1–4-го уровня риска (по классификации ВОЗ) [6]. Различают четыре уровня биологической безопасности (Biosafety Level/BSL по международной терминологии), которые состоят из комбинации лабораторных методов, оборудования и лабораторных объектов [6, 7]. Соответственно, все лаборатории для работы с ПБА делят на уровни биологической безопасности.

Для оценки состояния биологической безопасности нами был разработан универсальный перечень положений, контроль и исполнение которых, на наш взгляд, является важным, и на них необходимо обращать внимание при проведении обследований и мониторинга лабораторий различных уровней защиты. Все положения и требования в перечне в соответствии с концепцией биологической безопасности [5, 7] и положениями санитарно-эпидемиологических правил [1, 2] были разделены на несколько блоков: организационно-профилактический, медико-биологический и инженерно-технический.

К блоку организационно-профилактических мероприятий отнесли требования биологической безопасности, касающиеся наличия документов различного уровня: уставных и разрешительных документов, приказов о допуске персонала к работам с микроорганизмами II–IV групп патогенности, приказа о создании комиссии по контролю соблюдения требований биологической безопасности и протоколов заседаний комиссии по контролю соблюдения требований биологической безопасности, оперативного плана ликвидации послед-

ствий аварий при работе с микроорганизмами II–IV групп патогенности, программы проведения производственного контроля. К этой же группе отнесли документы, подтверждающие квалификацию сотрудников (дипломы о высшем и среднем специальном образовании, свидетельства, удостоверения, сертификаты о повышении квалификации), инструкции по соблюдению требований биологической безопасности при работе в лаборатории, стандартные операционные процедуры (СОП), журнал контроля доступа в лабораторию персонала и сторонних лиц.

К блоку инженерно-технических мероприятий отнесли вопросы инженерно-технического оснащения лаборатории: размещение «чистой» и «заразной» зоны, наличие плана проведения планово-предупредительного ремонта (ППР) оборудования лаборатории, актов и протоколов начала работы после ППР, паспортов на приточные и вытяжные системы вентиляции, договоров со сторонними организациями на обслуживание и контроль эффективности работы вентиляционных систем и высокоэффективных фильтров тонкой очистки воздуха, протоколов обследований инженерных систем, актов и протоколов проверки защитной эффективности инженерного оборудования, систем и аппаратов, размещения оборудования, планировки рабочих зон лаборатории («чистая»/«заразная») и контура герметизации с приборами контроля, наличие аварийной, пожарной и охранной сигнализации. Особое внимание уделяли наличию (или отсутствию) боксов микробиологической безопасности (БМБ) в лаборатории, сертификатов об оценке их эффективности, а также умению сотрудников готовить их к работе и работать в них. Проверяли направленность материальных, людских и воздушных потоков, обозначенных на плане разделения зон, размещение оборудования, наличие журналов контроля концентрации маточных и рабочих дезинфицирующих растворов, протоколов поверки средств измерения и аттестации устройств и приборов, обращали внимание на наличие журналов контроля работы УФ-облучателей, актов введения УФ-ламп в эксплуатацию, журналов проведения процессов автоклавирования; договоров и актов на уничтожение твердых отходов, журналов контроля вывоза отходов на полигон или в иные места для захоронения или уничтожения. Обращали внимание на использование, количество и качество имеющихся вариантов рабочей и защитной одежды, СИЗ, порядок их обеззараживания.

Для оценки состояния медико-биологического обеспечения работ проверяли: наличие договоров с территориальным медицинским учреждением на медицинское обслуживание и госпитализацию сотрудников в случае подозрения на инфекционное заболевание, вызванное контактом с микроорганизмами II группы патогенности; проведение необходимых профилактических прививок; размещение и комплектацию аварийных аптечек; наличие журналов, сертификатов или карт учета проведения профилактических прививок у персонала лабораторий против сибирской язвы, журнала входного медицинского контроля с данными о термометрии персонала, акта по результатам ежегодного профилактического медицинского осмотра и оформленных медицинских книжек у сотрудников лаборатории.

В ходе мониторинга практически во всех обследованных лабораториях были обнаружены нарушения, что значитель-

но увеличивало риск заражения персонала в случае возникновения аварийной ситуации или аварии.

Обследование начинали с осмотра зданий, размещения в них помещений лабораторий, состояния ограждающих строительных конструкций: стен, потолков, полов, дверей, откосы у стен, проверки благоустройства территории вокруг здания, установки решеток на окнах.

Лаборатории размещались в основном в специально построенных зданиях. Однако некоторые лаборатории были размещены в зданиях довоенной или послевоенной постройки, приспособленных затем под лаборатории. Территория вокруг зданий была в большинстве случаев благоустроена, но в некоторых местах благоустройство отсутствовало. Внутри помещения лаборатории не было четкого разделения на «чистую» и «заразную» зоны, отсутствовал контур герметизации. Это выражалось в том, что «чистая» зона сообщалась с «заразной» через передаточное окно, а не через шлюз, что является нарушением при передаче материала на исследование из помещения приема образцов в лабораторию. При возникновении аварийной ситуации также может произойти загрязнение окружающей среды, а при нарушении контура герметизации лаборатории с последующим выходом материала, содержащего микроорганизмы, наружу создается реальный риск и угроза. Доступ в лабораторию персонала и сторонних лиц, входной температурный контроль сотрудников, особенно тех, которые работают с микроорганизмами II группы патогенности (возбудители сибирской язвы, бруцеллеза, бешенства), проводился с нарушением требований биологической безопасности (ББ) – не было журнала измерения температуры.

При проверке разрешительных документов оказалось, что в некоторых лабораториях представленные санитарно-эпидемиологические заключения были без указания срока действия, то есть бессрочными. Однако это положение распространяется только на действие лицензии, а все санитарно-эпидемиологические заключения должны быть с указанием срока действия до пяти лет, то есть срочными [8]. На рабочих местах в лаборатории отсутствовали инструкции по соблюдению требований ББ при проведении операций и процедур с микроорганизмами на приборах, в БМБ, центрифугах и т.п.

В помещениях «заразной» зоны многих лабораторий полностью или частично отсутствовали инженерные системы ББ. В тех случаях, когда системы имелись, проверка их работоспособности и оценка защитной эффективности проводилась нерегулярно сотрудниками организаций, выигравших конкурс на проведение этих работ, но зачастую не имеющих представления о том, как должна работать та или иная инженерная система ББ. В некоторых лабораториях трубопроводы вентиляционных систем не были промаркированы (приток/вытяжка) или вообще были убраны за подвесной потолок. Конечные высокоэффективные фильтры тонкой очистки воздуха, установленные на вытяжных воздуховодах, не соответствовали классу защиты H14, а были ниже (класс H11) или отсутствовали совсем. Кроме того, фильтра-камеры с установленными в них фильтрами монтировались без прямого доступа, что затрудняло выполнение контрольных замеров и замену их при необходимости.

Основным рабочим помещением «заразной» зоны для работ с ПБА II–IV групп является микробиологический бокс. Это помещение достаточной площади с естественным и искусственным освещением, мебелью, покрытие которой устойчиво к воздействию моющих и дезинфицирующих растворов, установленным УФ-облучателем и предбоксом (тамбуром) для входа в него. Для проведения работ с ПБА III–IV групп помещение микробиологического бокса следует оборудовать вытяжной системой вентиляции с фильтрами класса не ниже H14. В микробиологическом боксе основным элементом защиты сотрудников при работе с ПБА является БМБ 2-го класса безопасности типа «А» без подключения к вытяжному воздуховоду системы вентиляции.

Микробиологический бокс для проведения работ с микроорганизмами II группы патогенности должен быть оборудован приточно-вытяжной системой вентиляции с фильтрами очистки воздуха с классом защиты не ниже H13 на притоке и не ниже H14 на выходе. Помещение микробиологического бокса комплектуют БМБ II класса типа «Б» с подключением к вытяжному воздуховоду системы вентиляции или БМБ III класса безопасности. Как показали результаты мониторинга, боксами микробиологической безопасности были оборудованы все лаборатории, но практически во всех обследованных лабораториях сотрудники не умели готовить БМБ к работе, не знали, что такое «дымовой тест» оценки динамичного входящего воздушного потока, с какой целью, как часто и в каком порядке он выполняется. Некоторые приемы работы сотрудников лабораторий, выявленные в ходе мониторинга, повергли проверяющих в шоковое состояние (работа в БМБ на коленях из-за неправильной установки БМБ или с поднятым защитным стеклом).

Во время проведения мониторинга было установлено, что в ветеринарных лабораториях зачастую используют защитные устройства (боксы), не предназначенные для работ с микроорганизмами. Они не имели государственной регистрации в качестве защитных устройств для работ с ПБА и не отвечали требованиям ББ, а в лаборатории отсутствовало заключение о защитной эффективности и, соответственно, документ о сертификации данного защитного устройства. Тогда как известно, что БМБ в настоящее время наряду с защитной одеждой и профилактическими прививками является основным элементом защиты работающего персонала.

Так как в некоторых лабораториях предбоксы отсутствовали, то раковины для мытья рук были установлены непосредственно в помещениях микробиологических боксов. Соответственно, холодная и горячая вода поступала в «заразное» помещение лаборатории без отсечки от магистрального водопровода. Одновременно с этим было установлено, что во многих лабораториях стоки из микробиологического помещения от раковин уходили в канализационную сеть без химического или термического обеззараживания.

Персонал лабораторий использовал в качестве рабочей одежды пижамы, костюмы хирургические и другие доступные комплекты одежды. К сожалению, эту одежду в лаборатории использовали не только в качестве рабочей одежды, но и в качестве защитной одежды при работе с ПБА в БМБ или во время работы с биопробными животными. В некото-

рых лабораториях в качестве защитной одежды использовали одноразовые хирургические халаты, изготовленные из нетканого материала. Средствами индивидуальной защиты органов дыхания для персонала служили хирургические маски, что является нарушением требований ББ при работе с микроорганизмами, поскольку хирургическая маска не защищает верхние дыхательные пути и слизистые человека от аэрозоля микроорганизмов, так как не соответствует 3-му классу безопасности (FFP3).

Ветеринарные лаборатории должны быть оборудованы системами и средствами пожарной, охранной и аварийной сигнализации. Но если к первым двум претензий не было, за исключением отсутствия в некоторых лабораториях решеток на окнах первого этажа, то с аварийной световой и звуковой сигнализацией дело обстояло иначе. В некоторых случаях аварийная сигнализация отсутствовала вообще, и мотивация была следующей: лаборатория маленькая, народу немного, «докричимся». Зачастую кнопка оповещения об аварии находилась в коридоре, а не у рабочего места. Аварийный извещатель был только один на всю лабораторию и находился в коридоре «заразной» зоны, без дополнительного вывода в «чистую» зону. Так как организация мероприятий по ликвидации последствий аварий является обязательным требованием ББ при проведении работ с ПБА независимо от группы патогенности, то в лабораториях необходимо было иметь планы ликвидации последствий аварий, аварийные комплекты защитной одежды и растворы дезинфектантов в микробиологических боксах.

Первичной специализации по работе с микроорганизмами с основами ББ сотрудники ветеринарных лабораторий, как другие специалисты, работающие с ПБА II группы, не проходят. Специализация осуществляется только на базе теоретического курса (72 ч), без закрепления практических приемов и наработки навыков безопасной работы с ПБА. Это приводит к тому, что у сотрудников лабораторий нет всеобъемлющего понимания вопросов ББ. Они не знают и не понимают многих положений и требований ББ. Например, как готовить защитное укрывное оборудование (БМБ) к работе, как его обеззаразить в случае аварийной ситуации, как часто необходимо проводить оценку его защитной эффективности, то есть сертифицировать. Нет понятия, почему использование в качестве защитной одежды хирургических, а тем более терапевтических халатов является нарушением требований биологической безопасности. Не на каждую процедуру подготовлена инструкция по ББ (СОП), а ведь положения, прописанные в этих документах, должны быть доведены до всего персонала лаборатории, и в тренировочных занятиях должны принимать участие все сотрудники.

Для обеспечения дезинфекционного режима в лаборатории при проведении работ с ПБА II–IV групп и материалами с подозрением на их содержание используют различные дезинфицирующие средства. Рабочие растворы дезинфектантов хранили в емкостях без указания даты приготовления и рабочей концентрации. Инструкции на рабочих местах по проверке рабочих растворов дезинфектантов зачастую отсутствовали. Не во всех лабораториях имелись экспресс-тест-полоски для проверки концентраций рабочих дезинфицирующих растворов. Все это могло привести к неправильному использованию растворов дезинфектантов и

аварийной ситуации. Анализируя большое количество препаратов, используемых в лабораториях, мы убедились в том, что закупки их проводились без учета задач, стоящих перед сотрудниками лаборатории, а по принципу «что дешевле». Мы считаем, что на первом месте в данном случае должна стоять безопасность, которая достигается использованием универсального дезинфицирующего средства при проведении работ с ПБА. До настоящего времени такими продолжают оставаться растворы перекиси водорода различной концентрации. Особенно это важно помнить при проведении работ с возбудителем *Bacillus anthracis* или материалом, подозрительным на содержание спор сибирской язвы [1, 2, 9].

Выявленные и перечисленные нарушения требований биологической безопасности можно считать типичными, и это заставляет обратить на них особое внимание руководства и заведующих лабораторий. В основном эти нарушения сводились к следующему:

- отсутствие «Инструкции по соблюдению требований биологической безопасности при работе с ПБА ...» на рабочих местах в лаборатории;
- отсутствие на рабочих местах обучения и тренировочных занятий с персоналом по ликвидации последствий аварий различного характера;
- использование сотрудниками лабораторий рабочей одежды для работы в защитных устройствах (БМБ) вместо комплектов защитной одежды;
- использование в качестве защитной одежды одноразовых халатов и шапочек, не являющихся аналогами противочумного костюма;
- использование для защиты органов дыхания хирургических масок вместо респираторов третьего класса защиты (FFP3);
- удаление и слив сточных вод из помещений «заразной» зоны в общую канализационную сеть без какого-либо предварительного обеззараживания или в «выгребные ямы», контроль обеззараживания в которых не ведется;
- вскрытие животных на открытых столах в металлической кювете без фиксации и без местных элементов вытяжной системы вентиляции.

Эти нарушения биологической безопасности могут стать причиной возникновения аварийных ситуаций, которые в свою очередь могут привести к серьезным последствиям: заболеванию сотрудников и выходу микроорганизмов в окружающую среду.

Использование рабочих помещений лабораторий не того уровня защиты для проведения работ и неправильная оценка риска или его занижение также могут привести к серьезным последствиям. Чтобы этого не произошло, необходимо постоянно совершенствовать систему биологической безопасности в ветеринарных лабораториях, снижать риск возникновения инфекционных заболеваний среди персонала и риск попадания патогенного материала в окружающую среду. Необходимо повысить уровень ответственности руководителей и сотрудников лабораторий, которым было предложено постоянное проведение следующих мероприятий с последующим контролем:

- повышение понимания руководством важности положений ББ, выделение материальных средств по совершен-

створению ББ в лаборатории и готовность выполнять необходимые мероприятия;

- осуществление регулярного мониторинга и анализа руководством состояния уровня ББ на местах;
- организация проведения соответствующей подготовки специалистов ветеринарных лабораторий по вопросам ББ с освоением практических приемов безаварийной работы с ПБА;
- целесообразно рассмотреть вопрос привлечения специалистов в области ББ для оказания консультативно-методической помощи руководителям по повышению уровня состояния ББ;
- признать необходимость повышения уровня оказания квалифицированной помощи при составлении технических заданий и других исходных материалов при планировании, реконструкции, перепланировке и ремонте помещений лабораторий, а также при проведении оценки защитной эффективности инженерных систем ББ, смонтированных в лабораториях.

Эти предложения позволят улучшить состояние ББ в ветеринарных лабораториях и повысить уровень знаний руководителей и сотрудников.

#### **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. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. 2013. 196 с.
2. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08. 2008. 95 с.
3. Санитарно-эпидемиологические правила. Дополнения и изменения №1 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2518-09. 2009. 4 с.
4. Санитарно-эпидемиологические правила. Дополнения и изменения №2 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2885-11. 2011. 1 с.
5. Тюрин ЕА. Организация условий соблюдения требований биологической безопасности при проведении работ с микроорганизмами I–IV групп патогенности в микробиологических лабораториях различных уровней защиты. В кн.: Правовые основы биозащиты и биобезопасности: монография. Отв. ред. А.А.Мохов, О.В.Сушкова. М.: «Прспект», 2020, с. 110-121. ISBN 978-5-392-31094-4.
6. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Женева. 3-е издание. ВОЗ. 2004. 139 с.
7. Дмитриева ВА, Воронин АМ, Дмитриев ВВ, Доброхотский ОН, Жариков ГА, Колумбет ЛВ, Наголкин АВ, Тюрин ЕА, Храмов МВ. Учебное пособие по биобезопасности. Тула: Изд-во ТулГУ; 2013. 500 с.
8. Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами». СП 1.3.1318-03. 2003, 27 с.
9. Тюрин ЕА, Маринин ЛИ. Использование дезинфекционных препаратов различной природы в ветеринарных лабораториях при проведении работ с микроорганизмами II–IV групп патогенности бактериальной и вирусной природы. Материалы IV национального конгресса бактериологов и международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». Омск, 2018 г., с. 72-73.

#### **References**

1. Sanitary and epidemiological rules "Safety of working with microorganisms of pathogenicity groups I–II (danger)". SP 1.3118-13, 2013, 196 p. (In Russian).
2. Sanitary and epidemiological rules "Safety of work with microorganisms of groups III–IV of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08, 2008, 95 p. (In Russian).
3. Sanitary and epidemiological rules. Additions and changes No 1 to SP 1.3.2322-08 "Safety of work with microorganisms of groups III–IV of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2518-09, 2009, 4 p. (In Russian).
4. Sanitary and epidemiological rules. Additions and changes No. 2 to SP 1.3.2322-08 "Safety of work with microorganisms of the III–IV groups of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2885-11, 2011, 1 p. (In Russian).
5. Tyurin EA. Organization of conditions for compliance with biological safety requirements when working with microorganisms of pathogenicity groups I–IV in microbiological laboratories of various levels of protection. In: Legal bases of bioeconomics and biosafety. Edited by A.A.Mokhov, O.V.Sushkova. Moscow: "Prospect" Publ., 2020, pp. 110-121. ISBN 978-5-392-31094-4. (In Russian).
6. Practical guidance on biological safety in the laboratory. Geneva. 3rd edition. WHO. 2004. 139 p. (In Russian).
7. Dmitrieva VA, Voronin AM, Dmitriev VV, Dobrokhotskii ON, Zharikov GA, Kolombet LV, Nagolkin AV, Tyurin EA, Khranov MV. A training manual on biosafety. Tula, 2013, 500 p. (In Russian).
8. Sanitary and epidemiological rules "Procedure for issuing a sanitary and epidemiological conclusion on the possibility of working with pathogens of human infectious diseases of groups I–IV of pathogenicity (danger), genetically engineered microorganisms, poisons of biological origin and helminths". SP 1.3.1318-03, 2003, 27 p. (In Russian).
9. Tyurin E A, Marinin LI. Use of disinfectants of various nature in veterinary laboratories when working with microorganisms of groups II–IV of pathogenicity of bacterial and viral nature. Proceedings of the IV National Congress of Bacteriologists and the International Symposium "Microorganisms and Biosphere "Microbios-2018". Omsk, 2018, pp. 72-73. (In Russian).

#### **Информация об авторе:**

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

#### **Information about author:**

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

# CRISPR/Cas-системы: характеристика и возможности использования для редактирования геномов бактерий

И.А.Блатов<sup>1</sup>, А.С.Щурова<sup>1</sup>, Д.Ю.Гущин<sup>1</sup>, С.Д.Зверева<sup>1</sup>, А.В.Попова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Московская область, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

CRISPR/Cas – адаптивная иммунная система бактерий и архей. Начиная с 2012 г., когда была реализована первая возможность использования системы CRISPR/Cas для редактирования генома, число исследований в этой области стремительно растет. На сегодняшний день редактирование, целью которого является модификация конкретных участков геномов различных организмов, рассматривается как одна из ключевых методологий современной биологии. Данный обзор посвящен истории открытия, классификации, структуре и механизмам работы CRISPR/Cas-систем, а также стратегиям CRISPR/Cas-редактирования геномов различных видов бактерий.

**Ключевые слова:** геномное редактирование, геном, система CRISPR-Cas, бактерии

**Для цитирования:** Блатов И.А., Щурова А.С., Гущин Д.Ю., Зверева С.Д., Попова А.В. CRISPR/Cas-системы: характеристика и возможности использования для редактирования геномов бактерий. Бактериология. 2020; 5(2): 38–48. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-38-48

## CRISPR/Cas-Systems: characteristics and possibilities of use for editing bacterial genomes

I.A.Blatov<sup>1</sup>, A.S.Shchurova<sup>1</sup>, D.Y.Guschin<sup>1</sup>, S.D.Zvereva<sup>1</sup>, A.V.Popova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

CRISPR-Cas is the adaptive immune system of bacteria and archaea. Since 2012, when the first opportunity to use the CRISPR/Cas system for genome editing was realized, the number of studies in this area has been growing rapidly. Today, genomic editing to modify specific regions of the genomes of various organisms is considered one of the key methodologies of modern biology. This review is devoted to the history of discovery, classification, structure, operational mechanisms of CRISPR-Cas systems and strategies for editing the genomes of various bacterial species using this technology.

**Key words:** genome editing, genome, CRISPR-Cas system, bacteria

**For citation:** Blatov I.A., Shchurova A.S., Guschin D.Yu., Zvereva S.D., Popova A.V. CRISPR/Cas-Systems: characteristics and possibilities of use for editing bacterial genomes. Bacteriology. 2020; 5(2): 38–48. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-38-48

### Краткая история открытия CRISPR/Cas-систем

В 1987 г. группа ученых под руководством Atsuo Nakata (Osaka University, Япония), изучая геном бактерии *Escherichia coli*, обнаружила необычные последовательности, состоящие из набора повторяющихся палиндромных фрагментов, разделенных уникальными участками [1].

В начале 1990-х гг. испанский исследователь Francisco Mojica (University of Alicante, Испания) установил наличие по-

вторяющихся последовательностей в геномах архей. По своей структуре эти последовательности оказались похожи на те, что были открыты японскими учеными [2]. На основании этого наблюдения Mojica сделал вывод, что последовательности могут участвовать в реализации важных для микроорганизмов функций, и назвал их SRSR (Short Regularly Spaced Repeats). Позже по его же предложению их переименовали в CRISPR (Clustered Regularly Short Palindromic

#### 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: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: popova\_nastya86@mail.ru

#### For correspondence:

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

Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: popova\_nastya86@mail.ru

Статья поступила 05.08.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

The article was received 05.08.2020, accepted for publication 15.09.2020

Repeats; кластеризованные, регулярно разделенные, короткие палиндромные повторы). В 2005 г. Mojica сообщил о том, что изучаемые последовательности совпадают с фрагментами геномов бактериофагов [3]. Это послужило основой для предположения, что наличие повторяющихся последовательностей в геномах микроорганизмов может быть связано с работой «иммунной системы» бактерий и архей. Другая группа, работающая независимо, примерно в то же время опубликовала аналогичные результаты [4].

В 2002 г. исследовательская группа из Голландии обнаружила группу генов, примыкающую к CRISPR-локусу, за счет чего данные гены были названы *cas* (CRISPR-associated genes) [5].

В 2005 г. Alexander Bolotin (French National Institute for Agricultural Research, Франция), изучая геном бактерии *Streptococcus thermophilus*, выявил ранее не описанный ген *cas*, кодирующий большой белок с нуклеазной активностью, который теперь известен как Cas9. Кроме того, было обнаружено, что спейсеры, гомологичные вирусным генам, имеют общую последовательность на одном из концов. Эта последовательность (PAM, protospacer adjacent motif, прилегающий мотив протоспейсера) необходима для распознавания нуклеазой конкретного участка вирусной ДНК [6].

В 2005 г. группа под руководством Eugene Koonin (US National Center for Biotechnology Information, США) предложила в качестве иммунного CRISPR-механизма РНК-интерференцию [7].

В 2007 г. Philippe Horvath (Danisco France SAS, Франция) и коллеги экспериментально показали, что CRISPR действительно является частью адаптивной иммунной системы бактерий. Они продемонстрировали, что при включении в CRISPR-кассету новых фрагментов фаговой ДНК бактериальные клетки *S. thermophilus* становятся невосприимчивыми к фагам, в геномах которых присутствуют идентичные последовательности [8]. Кроме того, они показали, что единственного белка Cas9 достаточно для осуществления процесса интерференции.

В 2008 г. John van der Oost (University of Wageningen, Нидерланды) et al. в своем исследовании показали, что спейсерные последовательности в геноме *E. coli* транскрибируются в малые РНК, называемые криспРНК (crRNA), которые направляют белки Cas к определенным ДНК-мишеням [9].

В том же году Luciano Marraffini и Erik Sontheimer (Northwestern University, США) продемонстрировали, что мишенью для CRISPR-системы является ДНК [10].

В 2010 г. Sylvain Moineau (University of Laval, Канада) и его коллеги показали, что CRISPR-Cas9 продуцирует двухцепочечные разрывы в конкретном месте ДНК-мишени в непосредственной близости от сайта PAM [11]. Они также подтвердили, что Cas9 является единственным белком-нуклеазой в системе CRISPR-Cas9. Это отличительная особенность систем CRISPR II типа, в которых интерференция осуществляется при участии одного большого белка в сочетании с криспРНК.

В 2010–2011 гг. Emmanuelle Charpentier (Umea University, Швеция, и University of Vienna, Австрия) и Jörg Vogel обнаружили недостающий компонент CRISPR-механизма, а именно короткую РНК, которую они назвали транс-активирующей

CRISPR-РНК (тракрРНК, tracrRNA) [12, 13]. Они же показали, что тракрРНК образует дуплекс с криспРНК и что именно этот дуплекс и направляет нуклеазу Cas9 к определенной мишени.

В 2011 г. Virginijus Šikšnys (Vilnius University, Литва) и его коллеги клонировали весь локус CRISPR-Cas из *S. thermophilus* (система типа II), экспрессировали его в *E. coli* и показали, что наличие приобретенного локуса обеспечивает невосприимчивость к определенным плазмидам [14]. Это позволило предположить, что системы CRISPR являются автономными модулями, и подтвердило, что все необходимые компоненты системы типа II были уже известны. В 2012 г. Virginijus Šikšnys и его группа продемонстрировали возможность перепрограммирования Cas9 путем изменения последовательности криспРНК [15]. К аналогичным выводам пришли Emmanuelle Charpentier и Jennifer Doudna (University of California, США), которые также сообщили, что криспРНК и тракрРНК могут быть слиты вместе для создания единой гидовой РНК, что еще больше упрощает систему [16].

Таким образом, именно 2012 г. является началом отсчета для возможности использования систем CRISPR/Cas как биотехнологического инструмента.

### Структура и механизм работы CRISPR/Cas-систем

CRISPR/Cas – адаптивная иммунная система бактерий и архей – представлена CRISPR-локусом, экспрессирующим некодирующие РНК, и генами *cas* (CRISPR-associated), кодирующими Cas-нуклеазы, обеспечивающие гидролиз целевой ДНК [17].

CRISPR-локус состоит из лидерной последовательности, задающей направление транскрипции CRISPR-касеты, коротких палиндромных повторов и участков уникальной ДНК – спейсеров, гомологичных последовательностям чужеродных ДНК (протоспейсерам), обеспечивающих специфичность действия системы [8] (рис. 1).

Лидерные последовательности, ответственные за регуляцию транскрипции CRISPR-кассет и, следовательно, за функционирование всей CRISPR/Cas-системы, представлены АТ-богатыми участками (длиной 400 п.н.), которые не содержат открытых рамок считывания [5, 19].

CRISPR-касеты – участки геномов, содержащие CRISPR-повторы, разделенные спейсерами. Повторы имеют частичную симметрию, благодаря которой при транскрипции их концы могут комплементарно взаимодействовать, образуя устойчивые вторичные структуры – шпильки [20], играющие важную роль при взаимодействии с Cas-белками [21]. Спейсеры, как правило, имеют одинаковый размер (30–40 п.н.) и комплементарны выборочным участкам вирусных и плазмидных геномов [3, 4, 6].

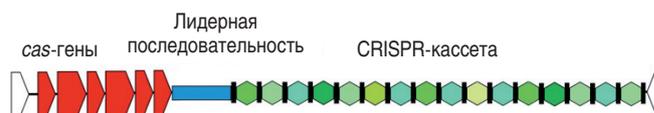


Рис. 1. Схема системы CRISPR/Cas: CRISPR-кассета представлена повторами (черные прямоугольники), разделенными уникальными спейсерами (шестиугольники зеленого цвета); красным цветом обозначены *cas*-гены, синим – лидерная последовательность CRISPR-касеты ([18] с модификациями).

В непосредственной близости от CRISPR-кассет находят локусы *cas*-генов. Кодируемые ими Cas-белки содержат функциональные домены, обеспечивающие различные взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, что способствует реализации молекулярных механизмов адаптивного иммунитета [22].

Работу систем CRISPR-Cas можно разделить на три этапа (рис. 2): адаптация – процесс, в результате которого формируются новые спейсеры; экспрессия криспрПНК (от англ. *crisprRNA*) – транскрипция прекрПНК с последующим процессингом коротких криспрПНК, нацеленных на определенную мишень в чужеродной ДНК, и интерференция – процесс деградации ДНК [8] или РНК [23], содержащей протоспейсер, комплементарный спейсеру [24].

В процессе адаптации осуществляется выбор нового спейсера и его интеграция в CRISPR-кассету. Маркером протоспейсера в чужеродной ДНК является короткий прилегающий мотив – PAM [25], позволяющий CRISPR/Cas-системе бактерий отличить собственную ДНК от чужеродной. Например, в системах CRISPR/Cas второго класса типа IIA к 3'-концу протоспейсера прилегает мотив NGG (реже – NGA, где N – любой нуклеотид).

Следующим этапом является транскрипция CRISPR-локуса, в результате которой образуется длинная некодирующая пре-криспрПНК, в состав которой входят множественные повторы и спейсеры. В результате процессинга первичного транскрипта образуются короткие зрелые криспрПНК, каждая из которых содержит один спейсер, фланкированный фрагментами повторов. Так, зрелые криспрПНК *Streptococcus pyogenes* содержат 20 нуклеотидов спейсера, расположенных с 5'-конца, и 19–22 нуклеотидов повтора на 3'-конце [12].

В ходе третьего этапа, интерференции, зрелая криспрПНК вместе с белками Cas формирует эффекторный комплекс, который распознает последовательность протоспейсера в чужеродной ДНК или РНК за счет образования комплементарных пар между мишенью и спейсером криспрПНК. Узнавание ДНК-мишени приводит к ее разрезанию и последующей деградации. При этом нуклеазная активность обеспечивается либо непосредственно эффекторным комплексом, либо за счет привлечения дополнительных Cas-белков [26].

### Классификация CRISPR/Cas-систем

Современная классификация систем CRISPR/Cas, основанная на составе белков эффекторного комплекса, а также способе генерации криспрПНК, включает в себя шесть типов систем CRISPR/Cas (I–VI) и тридцать три подтипа, объединенных в два класса [28]. К первому классу относятся системы CRISPR/Cas с мультибелковыми эффекторными комплексами (типы I, III и IV), в системах второго класса эффекторный комплекс состоит из одного белка (типы II и V и VI). Внутри каждого класса выделяют несколько типов, для которых характерно присутствие в составе эффекторного комплекса ключевого белка, который отсутствует в системах других типов [29, 30]. Каждый тип дополнительно подразделяют на несколько подтипов. Подтипы принято обозначать римской цифрой I и буквой латинского алфавита.

К первому классу относят системы I (характерной чертой является наличие гена *cas3*) и III (ген *cas10*) типов [29, 30].

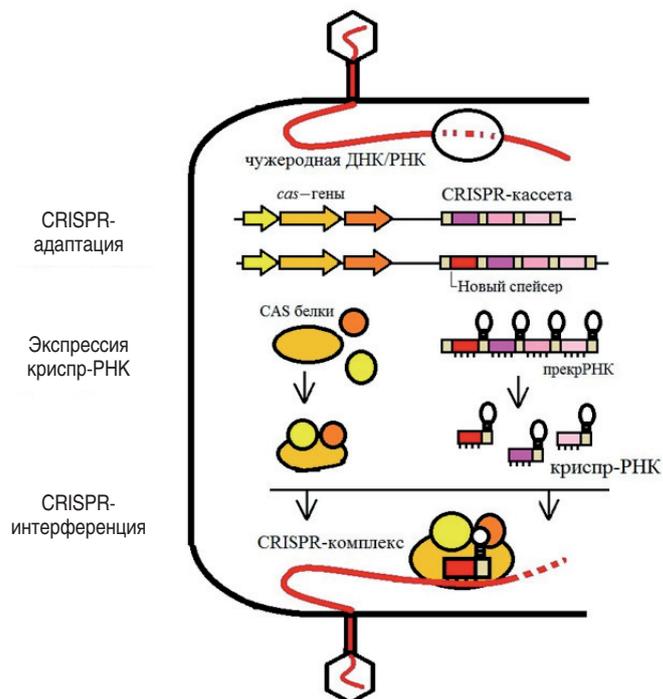


Рис. 2. Схема функционирования систем CRISPR/Cas ([27], с модификациями). Три основные функции CRISPR/Cas-систем: адаптация – встраивание новых спейсеров в CRISPR-кассету, экспрессия – созревание криспрПНК, интерференция – распознавание и деградация чужеродной ДНК или РНК.

Кроме того, выделяют функционально не охарактеризованный IV тип систем CRISPR/Cas (ген *cas1*) [30].

Ко второму классу относят системы II (ген *cas9*), V (ген *cas12*) и VI (ген *cas13*) типов [29–32]. В системах второго класса эффекторный комплекс представлен единственным мультидоменным белком [30]. Системы CRISPR-Cas II типа являются одними из наиболее изученных. Характерной чертой данного типа является наличие нуклеазы Cas9 – мультидоменного белка, который образует вместе с криспрПНК эффекторный комплекс и расщепляет ДНК-мишень, а также участвует в процессе адаптации [33–35].

### Стратегии CRISPR/Cas-редактирования геномов бактерий

Современный подход редактирования геномов бактерий в большинстве случаев основан на использовании программируемых нуклеаз из CRISPR/Cas-систем 2-го класса, прежде всего нуклеазы Cas9 (II типа) из *S. pyogenes* (spCas9), которые в комплексе с направляющей (гидовой) РНК (гРНК) распознают мишень ДНК, фланкированную специфической последовательностью PAM, и вносят двухцепочечный разрыв в последовательность ДНК, точно соответствующую гРНК [13, 36].

Матрица для гомологичной рекомбинации обычно представлена последовательностью, которая содержит модификации сайта-мишени (например, мутации в PAM), а также фланкирующие участки ДНК (плечи, гомологичные редактируемой последовательности, необходимые для осуществления рекомбинации). Разрыв ДНК-мишени нуклеазами системы CRISPR-Cas9 без редактирования чаще всего приводит к гибели бактериальных клеток, что позволяет фактически ис-

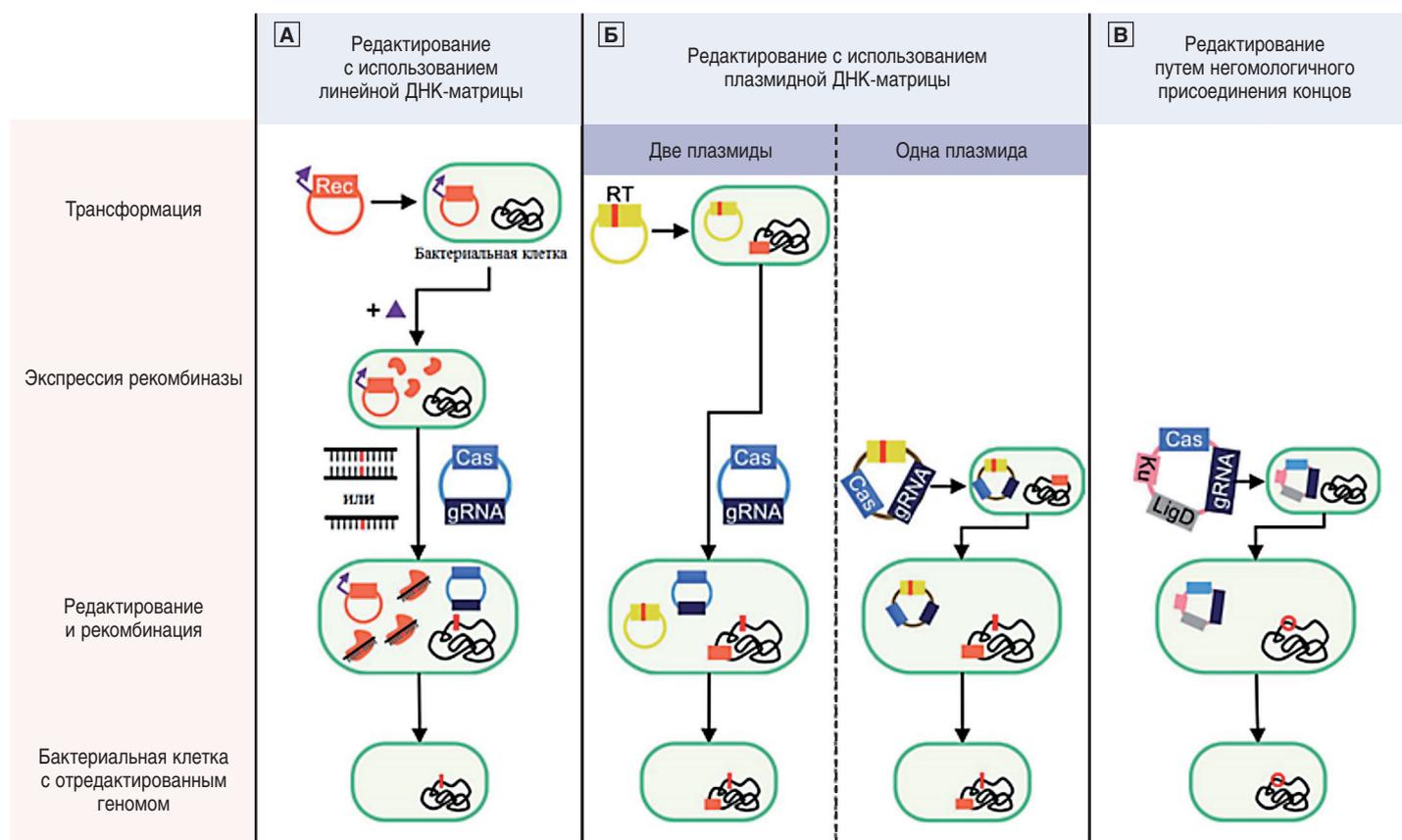


Рис. 3. Различные стратегии CRISPR/Cas-редактирования бактериальных геномов: А. CRISPR/Cas-редактирование путем рекомбинации с использованием линейной ДНК-матрицы и последующей селекцией Cas-нуклеазой. Бактериальную клетку последовательно трансформируют сначала плазмидой, кодирующей гетерологичную рекомбиназу (*Rec*), и после индукции ее экспрессии линейной ДНК-матрицей и плазмидой, кодирующей Cas-нуклеазу. Б. CRISPR/Cas-редактирование путем рекомбинации с использованием плазмидной матрицы (*RT*) и гетерологичной рекомбиназы (или без нее). Матрица для рекомбинации может быть локализована в составе плазмиды, несущей компоненты CRISPR/Cas-системы, или в составе отдельной плазмиды. В. CRISPR/Cas-редактирование путем нехомологичного присоединения концов (*NHEJ*). В зависимости от штамма в состав плазмидного вектора с компонентами CRISPR/Cas-системы, трансформируемого в бактериальную клетку, могут быть включены гены *ku* и/или *ligD* [36], с модификациями).

пользовать этот феномен для селекции тех бактерий, у которых произошла рекомбинация [36]. После внесения двухцепочечного разрыва редактирование генома бактерий может быть осуществлено посредством гомологичной рекомбинации или, в некоторых случаях, нехомологичного присоединения концов (*NHEJ*, non-homologous end joining) [36, 37].

Впервые возможность CRISPR/Cas-редактирования геномов прокариотических организмов была продемонстрирована на примере *Streptococcus pneumoniae* и *E. coli* [38], после чего методология начала активно применяться для решения различных исследовательских задач, связанных с редактированием геномов других видов бактерий. Существующие стратегии редактирования варьируют в зависимости от используемой нуклеазы, механизма рекомбинации, типа ДНК-матрицы для рекомбинации и количества используемых плазмид. Несмотря на это разнообразие, опубликованные алгоритмы работы могут быть отнесены к одной из трех различных стратегий, выбор которой обусловлен типом матрицы, используемой для рекомбинации [36].

Первая стратегия связана с использованием линейной ДНК в качестве матрицы для рекомбинации, а также гетерологичной ДНК-рекомбиназы фагового происхождения (рис. 3А).

Данная стратегия подразумевает первоначальную трансформацию бактериальной клетки плазмидой, содержащей систему для осуществления рекомбинации, затем индукцию экспрессии рекомбиназы и, наконец, совместную трансформацию линейной матрицы ДНК (часто короткого олигонуклеотида, но иногда и двухцепочечного фрагмента ДНК) и плазмиды, или нескольких плазмид, кодирующих Cas-нуклеазы и гидовую РНК. Одним из ключевых требований при этом является наличие гетерологичной рекомбиназы, которая обеспечивает эффективную рекомбинацию в интересующем штамме. На сегодняшний день в исследовательской практике используются несколько рекомбиназ. Например, в самой первой работе, посвященной редактированию генома *E. coli* с помощью нуклеазы *spCas9*, авторы использовали рекомбиназу системы  $\lambda$ -Red, чтобы внести изменения в геном с использованием линейной двухцепочечной матрицы ДНК [38]. Впоследствии системы  $\lambda$ -Red использовались для редактирования геномов других бактерий (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*), где для осуществления рекомбинации был необходим только  $\beta$ -белок системы  $\lambda$ -Red [39]. Для внесения точечных мутаций с высокой эффективностью в геномы некоторых грамположительных бактерий (*Lactobacillus reuteri*) также использовались

рекомбиназы RecT [40]. Однако необходимо учитывать, что рекомбиназы RecT должны быть получены только из родственных для бактерии фагов. Кроме того, помимо функционально активной рекомбиназы, эффективность трансформации штамма должна быть достаточно высокой, чтобы по крайней мере в одной бактериальной клетке, трансформированной линейной ДНК-матрицей и плазмидами с компонентами CRISPR-Cas, произошла успешная рекомбинация. CRISPR/Cas-редактирование с использованием линейных ДНК-матриц можно достаточно эффективно применять для внесения в геном точечных мутаций и небольших делеций, однако в случае необходимости получения более крупных делеций эффективность редактирования при таком подходе сильно снижается [41].

Вторая стратегия подразумевает использование в качестве матрицы для рекомбинации плазмидную ДНК (рис. 3Б). При этом матрица для осуществления рекомбинации содержится либо на той же плазмиде, что и компоненты системы CRISPR/Cas, либо на отдельной плазмиде. Для осуществления рекомбинации могут быть использованы как гетерологичные рекомбиназы (например, система  $\lambda$ -Red) [39, 42], так и собственные механизмы рекомбинации бактериальных клеток. Например, внесение точечной мутации в ген *lacZ* *E. coli* с помощью нуклеазы spCas9 и плазмиды с матрицей, содержащей гомологичные плечи (размером примерно 1000 п.н.), происходило без гетерологичной рекомбиназы с помощью RecA-зависимого механизма гомологичной рекомбинации [43]. Тем не менее в другом исследовании, посвященном редактированию генома *E. coli*, авторы констатировали, что гетерологичная рекомбиназа все-таки необходима при использовании плазмидой матрицы, однако в этом случае осуществлялась вставка целого гена [44]. Помимо *E. coli*, с использованием плазмидой матрицы без гетерологичной рекомбиназы также удалось успешно провести редактирование геномов и других микроорганизмов – представителей родов *Bacillus* [45], *Clostridium* [46], *Lactobacillus* [40, 47], *Pseudomonas* [48], *Streptomyces* [49] и *Staphylococcus* [50]. Несомненно, использование эндогенного механизма для гомологичной рекомбинации упрощает процесс редактирования, поскольку для этого требуется использование только одного или двух плазмидных векторов, содержащих матрицу для рекомбинации и компоненты системы CRISPR-Cas. Однако этот механизм может отсутствовать или быть недостаточно активен у некоторых бактерий, что потребует идентификации рекомбиназ, функционирующих у конкретного вида бактерии, и использования гетерологичных рекомбиназ [36].

Третья стратегия CRISPR/Cas-редактирования подразумевает модификацию геномов бактерий путем негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) – основного способа репарации двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных системой CRISPR-Cas (рис. 3В). Такой подход может быть достаточно эффективным для введения мутаций, обуславливающих снижение жизнеспособности клетки. У бактерий реализация механизма NHEJ связана с двумя белками: Ku и LigD. Белок Ku связывает, а белок LigD лигирует концы разрезанной ДНК, что часто приводит к неспецифическим мутациям, вставкам или делециям [37]. В одной из работ Sun et al. [51] достигли частоты NHEJ 70% путем трансформации

штамма *Mycobacterium smegmatis*, несущего функциональные копии генов *ku* и *ligD*, плазмидой, кодирующей нуклеазу Cas12a из *Francisella tularensis* (FnCas12a) и гидовую РНК. Tong et al. [52] показали, что возможно генерировать различные делеции в штамме *Streptomyces coelicolor*, несущем функциональный ген *ku*, путем введения гена *ligD* из близкородственного *Streptomyces carneus*. Li et al. [53] генерировали небольшие делеции и, относительно редко, крупные делеции путем трансформации *S. coelicolor* без функционально активного механизма NHEJ плазмидой, содержащей гены *ligD* и *ku*, а также ген, кодирующий FnCas12a и гидовую РНК. Однако стоит отметить, что только четверть прокариот, по различным оценкам, кодируют белки Ku [54]. Кроме того, гиперэкспрессия генов *ligD* и *ku* может быть цитотоксична для бактерий [53] и приводить к мутациям вне мишени из-за репарации спонтанных разрывов двухцепочечной ДНК. Наконец, экспрессия этих генов может не приводить к делециям [43]. В целом необходимы дополнительные исследования, использующие эту стратегию, чтобы полностью реализовать ее потенциал для редактирования бактериальных геномов.

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

Поскольку программируемое расщепление ДНК и редактирование генома *E. coli* впервые было показано с использованием нуклеазы spCas9 (Cas9) [16, 38], то именно эта нуклеаза наиболее часто использовалась в экспериментах по редактированию геномов других бактерий. Эту тенденцию частично можно объяснить тем, что spCas9 представляет собой одну из первых хорошо охарактеризованных односубъединичных эффекторных нуклеаз (для осуществления двухцепочечного разрыва ДНК требуется только экспрессия Cas9 и гидовой РНК) с относительно простой последовательностью PAM и стабильной экспрессией в клетках различных организмов. Однако избыточная экспрессия spCas9 может быть цитотоксичной для бактериальных клеток, что создает потенциальный барьер для широкого использования данной нуклеазы с целью геномного редактирования. Так, в одном из исследований было показано, что избыточная экспрессия каталитически неактивной формы spCas9 (dCas9) в *E. coli* стала причиной аномальной морфологии и снижения скорости роста бактериальных клеток, что предположительно указывает на то, что цитотоксичность spCas9 может быть связана не только с нуклеазной активностью [55]. В другом исследовании было показано, что экспрессия spCas9 без гидовой РНК в *Corynebacterium glutamicum* приводила к отсутствию роста бактериальных колоний, таким образом, spCas9 может быть цитотоксичным сам по себе [56].

В настоящее время рассматривается несколько подходов для решения проблемы цитотоксичности spCas9. Одним из них является использование индуцибельных систем экспрессии spCas9, чтобы гарантировать отсутствие мишень-зависимой гибели клетки в отсутствие индуктора [57]. В одной из работ авторы получили конструкцию, в которой перед геном spCas9 находился индуцируемый маннозой

промотор, чтобы минимизировать внесение разрывов в ДНК *Bacillus subtilis* до того, как трансформированные клетки будут высеяны на питательную среду с маннозой [45]. В другом исследовании было показано, что экспрессия spCas9 под контролем индуцируемого тетрациклином промотора приводит к значительно более эффективному редактирова-

нию генома *Clostridium acetobutylicum*, чем в случае конститутивной экспрессии spCas9 [57].

В случае мутации одного из каталитических остатков spCas9 нуклеаза становилась способной разрезать только одну нить ДНК и получила название «никаза» (nCas9) [13]. Однако на сегодняшний день требуется проведение допол-

Таблица. Примеры редактирование геномов бактерий с использованием систем CRISPR-Cas

№	Штамм	Нуклеаза	Система рекомбинации	Матрица для рекомбинации	Тип модификации генома	Ссылки
1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	SpCas9	–	Плаزمида	Делеция, замена нуклеотида (SNP)	[45]
					Делеция, вставка, SNP	[68]
2	<i>Bacillus smithii</i> ET 138	SpCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка, SNP	[69]
3	<i>Bacillus licheniformis</i> DW2	nCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка	[70]
4	<i>Cl. acetobutylicum</i> ATCC 824	nCas9	–	Плазмида	Делеция	[71]
		SpCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка, SNP	[57]
5	<i>Cl. beijerinckii</i> NCIMB 8052	nCas9	–	Плазмида	Делеция	[71]
				Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[65]
6	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	nCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка	[72]
7	<i>Clostridium difficile</i> R20291	SpCas9	–	Плазмида	SNP	[73]
	<i>Cl. difficile</i> 630				Делеция, вставка	[74]
8	<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	Cas12a	–	–	Делеция	[59]
		SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[46]
9	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[56]
	<i>C. glutamicum</i> B1			–	–	
10	<i>C. glutamicum</i> B226	Cas12a	RecT	Плазмида	Делеция, вставка	[75]
	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032			–	Двухцепочечная линейная ДНК или плазмида	
11	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i> B230	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олиго-нуклеотид	SNP	[56]
	<i>C. acetoacidophilum</i> B299			–	–	
12	<i>Corynebacterium pekinense</i> B3	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[56]
	<i>Corynebacterium crenatum</i> B6			–	–	
13	<i>E. coli</i> MG1655	SpCas9	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[38]
		nCas9	–	Плазмида	вставка, делеция, SNP	[76]
14	<i>E. coli</i> BW25113	nCas9	–	–	вставка, делеция, SNP	[42]
		Cas12a	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция	[77]
15	<i>E. coli</i> BW25113	Cas12a	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[60]
				Двухцепочечная линейная ДНК	Замена гена	
16	<i>E. coli</i> BW25113	dCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[62]
				–	–	–
17	<i>E. aerogenes</i> IAM1183	SpCas9	λ-Red	Двухцепочечная линейная ДНК	Делеция	[78]
		nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутации	
18	<i>K. pneumoniae</i> KP_1.6366	SpCas9	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция	[64]
				Двухцепочечная линейная ДНК	–	
19	<i>K. pneumoniae</i> KP_3744	SpCas9	λ-Red	Плазмида	Делеция	[64]
				–	–	
20	<i>K. pneumoniae</i> KP_5573	nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	

Таблица. Примеры редактирование геномов бактерий с использованием систем CRISPR-Cas (окончание)						
16	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC367	SpCas9	RecE/T	Плазмида	Делеция	[79]
17	<i>Lactobacillus casei</i> LC2W	nCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка	[80]
18	<i>Lactobacillus lactis</i> MG1363	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[47]
	<i>L. lactis</i> NZ9000	SpCas9	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP, делеция, вставка	[81]
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1		RecE/T	Двухцепочечная линейная ДНК или плазмида	Делеция, вставка	[79]
	<i>L. plantarum</i> WJL	SpCas9	RecT	ss oligo	SNP	[40]
	<i>L. plantarum</i> NIZO2877		–	Плазмида	SNP, делеция	
20	<i>L. reuteri</i> 6475	SpCas9	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[82]
21	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	SpCas9	–	Плазмида	SNP	[83]
		nCas9	–			
22	<i>M. smegmatis</i> mc2155	Cas12a	–	Отсутствует (NHEJ)	SNP, делеция, вставка	[51]
			gp60, gp61	Одноцепочечный олигонуклеотид		[60]
23	<i>P. aeruginosa</i> PAK			Плазмида	Делеция, вставка	[63]
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	SpCas9	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция	
				Двухцепочечная линейная ДНК		
		nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	
24	<i>Pseudomonas fluorescens</i> GcM5-1A	nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[63]
25	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	SpCas9	λ-Red	Плазмида	Делеция, вставка, SNP	[84]
			Redβ	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[39]
			Ssr	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[41]
			–	Плазмида	Делеция	[48]
26	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[63]
27	<i>Streptomyces albus</i> J1074	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[85]
28	<i>S. coelicolor</i> A3	SpCas9		Отсутствует (NHEJ)	Делеция	[52]
			Плазмида	Делеция, SNP		
	<i>S. coelicolor</i> M145		–	Плазмида	Делеция, SNP	[49]
		Cas12a		Отсутствует (NHEJ)	Делеция	[53]
29	<i>Streptomyces lividans</i> 66	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[85]
30	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> SIPI-KF	Cas12a	–	Плазмида	Делеция	[53]
31	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> HCCB10218	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[49]
32	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[85]
33	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		EF2132	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[86]
	<i>S. aureus</i> RN4220	SpCas9			Делеция, вставка, SNP	[50]
	<i>S. aureus</i> Newman		–	Плазмида		
	<i>S. aureus</i> USA300				Делеция	
	<i>S. pneumoniae</i> crR6	SpCas9	–	Двухцепочечная линейная ДНК	SNP	[38]
	<i>S. pneumoniae</i> R6_8232.5					
35	<i>Tatumella citrea</i> DSM 13699	SpCas9	λ-Red	Плазмида	Делеция	[42]
36	<i>Yersinia pestis</i> KIM6+	Cas12a	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[60]

нительных исследований, чтобы понять механизм редактирования генома с помощью nCas9 и исследовать возможности по улучшению редактирования с ее использованием.

Другой альтернативой spCas9 является использование нуклеаз типа V-A, Cas12a. Эти нуклеазы обладают существен-

ными различиями по сравнению с Cas9, такими как распознавание T-богатого PAM или образование 5'-липкого конца при разрезании ДНК [58]. Jiang et al. описали случай неудачной попытки трансформировать клетки *C. glutamicum* плазмидным вектором для экспрессии spCas9 или nSpCas9, в то

время как плаزمид с нуклеазой Cas12a из *Francisella novicida* (FnCas12a) была успешно использована для трансформации с последующим редактированием [54]. Впоследствии нуклеаза Cas12a также была использована как совместно с гетерологичной рекомбиназой, так и без нее для осуществления делеций, вставок и введения мутаций в геномы некоторых других видов бактерий [56, 59, 60]. В целом нуклеаза Cas12a может являться удобным инструментом для эффективного геномного редактирования, хотя необходимо проведение дополнительных исследований для более полного понимания преимуществ и ограничений использования данной нуклеазы.

Недавно был разработан альтернативный подход для редактирования геномов, подразумевающий использование модифицированных нуклеаз, называемых редакторами оснований. Редакторы оснований, как правило, содержат химеры dCas9 или nCas9 и домена цитидин-деаминазы и преобразуют цитидины в урацилы на нецелевой цепи в определенном участке рядом с PAM [61]. Редакторы оснований были использованы для редактирования бактериальных геномов *E. coli* [62], *Pseudomonas aeruginosa* [63], *K. pneumoniae* [64] и *Clostridium beijerinckii* [65] с целью внесения точечных мутаций или вставки преждевременных стоп-кодонов. Метод с использованием редакторов оснований достаточно прост, поскольку он требует трансформации только одной плазмиды, содержащей модифицированную нуклеазу и гРНК.

Еще одна стратегия для решения проблемы цитотоксичности spCas9 заключается в использовании эндогенной CRISPR-Cas-системы бактериального хозяина. По предварительной оценке, до половины всех видов бактерий могут содержать эндогенные системы CRISPR-Cas [66], и использование этих систем может обеспечить эффективное редактирование без необходимости экспрессии гетерологичной нуклеазы [67]. Однако чтобы использовать эндогенные системы для редактирования геномов, они должны быть достаточно хорошо охарактеризованы, включая идентификацию PAM и обеспечение активной экспрессии генов *cas*.

В таблице представлены примеры CRISPR/Cas-редактирования геномов различных видов бактерий.

В заключение необходимо подчеркнуть, что для осуществления редактирования генома бактерий с помощью системы CRISPR/Cas необходимо соблюдение ряда условий: во-первых, бактерия должна быть культивируемой, кроме того, эффективность трансформации в интересующем штамме должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить доставку как компонентов CRISPR/Cas, так и компонентов, необходимых для гомологичной рекомбинации. В связи с этим использование эффективных рекомбиназ, а также регулируемых промоторов в интересующем штамме может способствовать повышению эффективности геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas.

#### 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

The work was carried out with the financial support of the grant Ministry of Science and Higher Education of the Russian

Federation Russian Federation (Agreement No. 075-15-2019-1671 of October 31, 2019) and the Industry Program of Rosпотребнадзор.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература/References

1. 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
2. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993;9(3):613-621. DOI:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x
3. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174-182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3
4. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiolog.* 2005;151:653-663. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0
5. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565-1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
6. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151:2551-2561. DOI: 10.1099/mic.0.28048-0
7. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* 2006;1:7. DOI: 10.1186/1745-6150-1-7
8. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140
9. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008;321(5891):960-964. DOI: 10.1126/science.1159689
10. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science.* 2008;322:1843-1845. DOI: 10.1126/science.1165771
11. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67-71. DOI: 10.1038/nature09523
12. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011;471:602-607. DOI: 10.1038/nature09886
13. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
14. Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res.* 2011;39(21):9275-9282. DOI: 10.1093/nar/gkr606
15. Siksnys V, Gasiunas G, Karvelis T. RNA-directed DNA cleavage by the Cas9-crRNA complex from CRISPR3/Cas immune system of *Streptococcus thermophilus*. U.S. Provisional Patent Application 61/613,373, filed March 20, 2012; later published as US2015/0045546.

16. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21. DOI: 10.1126/science.1225829
17. Смирнов АВ, Юнусова АМ, Лукьянчикова ВА, Баттулин НР. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):493-510. DOI: 10.18699/VJ16.175 / Smirnov AV, Yunusova AM, Lukiyanchikova VA, Battulin NR. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):493-510. DOI: 10.18699/VJ16.175 (In Russian).
18. Пугач КС, Лопатина АВ, Северинов КВ. CRISPR-системы адаптивного иммунитета прокариот. Молекулярная биология. 2012;46(2):195-203. / Pougach KS, Lopatina AV, Severinov KV. Crispr adaptive immunity systems of prokaryotes. *Molecular Biology*. 2012;46(2):175-182. (In Russian).
19. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(3):181-186. DOI: 10.1038/nrmicro1793
20. Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*. 2007;8(4):R61. DOI: 10.1186/gb-2007-8-4-r61
21. Jackson RN, Golden SM, van Erp PB, Carter J, Westra ER, Brouns SJ, et al. Structural biology. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science*. 2014;345(6203):1473-1479. DOI: 10.1126/science.1256328
22. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 2005;1(6):e60. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0010060
23. Hale CR, Coczaki 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
24. 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
25. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt 3):733-740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0
26. Закиян СМ, Медведев СП, Дементьева ЕВ, Покушалов ЕА, Власов ВВ. Редактирование генов и геномов. Рос. акад. наук, Сиб. отделение, ФИЦ Ин-т цитологии и генетики. 2018;1(2):369. / Zakiyan SM, Medvedev SP, Dementeva EV, Pokushalov EA, Vlasov VV. Editing genes and genomes. Russian Academy of Sciences. Siberian Branch, Institute of Cytology and Genetics. 2018;1(2):369. (In Russian).
27. Savitskaya EE, Musharova OS, Severinov KV. Diversity of CRISPR-Cas-Mediated Mechanisms of Adaptive Immunity in Prokaryotes and Their Application in Biotechnology. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(7):653-661. DOI: 10.1134/S0006297916070026
28. 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
29. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-477. DOI: 10.1038/nrmicro2577
30. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569
31. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*. 2015;60:385-397.
32. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2017b;15:169-182.
33. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-E2586. DOI: 10.1073/pnas.1208507109
34. Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*. 2015;519(7542):199-202. DOI: 10.1038/nature14245
35. Wei Y, Terns RM, Terns MP. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation. *Genes Dev*. 2015;29(4):356-361. DOI: 10.1101/gad.257550.114
36. Vento JM, Crook N, Beisel CL. Barriers to genome editing with CRISPR in bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2019;46(9-10):1327-1341. DOI: 10.1007/s10295-019-02195-1
37. Shuman S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):852-861. DOI: 10.1038/nrmicro1768
38. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):233-239. DOI: 10.1038/nbt.2508
39. Wu Z, Chen Z, Gao X, Li J, Shang G. Combination of ssDNA recombineering and CRISPR-Cas9 for *Pseudomonas putida* KT2440 genome editing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(6):2783-2795. DOI: 10.1007/s00253-019-09654-w
40. Leenay RT, Vento JM, Shah M, Martino ME, Leulier F, Beisel CL. Genome Editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* Revealed That Editing Outcomes Can Vary Across Strains and Between Methods. *Biotechnol J*. 2019;14(3):e1700583. DOI: 10.1002/biot.201700583
41. Aparicio T, de Lorenzo V, Martínez-García E. CRISPR/Cas9-Based Counterselection Boosts Recombineering Efficiency in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol J*. 2018;13(5):e1700161. DOI: 10.1002/biot.201700161
42. Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system [published correction appears in *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jun 15;82(12):3693]. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(7):2506-2514. DOI: 10.1128/AEM.04023-14
43. Cui L, Bikard D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(9):4243-4251. DOI: 10.1093/nar/gkw223
44. Bassalo MC, Garst AD, Halweg-Edwards AL, et al. Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli*. *ACS Synth Biol*. 2016;5(7):561-568. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00187
45. Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(17):5421-5427. Published 2016 Aug 15. DOI: 10.1128/AEM.01453-16
46. Huang H, Chai C, Li N, Rowe P, Minton NP, Yang S, et al. CRISPR/Cas9-Based Efficient Genome Editing in *Clostridium ljungdahlii*, an Autotrophic Gas-Fermenting Bacterium. *ACS Synth Biol*. 2016;5(12):1355-1361. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00044
47. Van der Els S, James JK, Kleerebezem M, Bron PA. Versatile Cas9-Driven Subpopulation Selection Toolbox for *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(8):e02752-17. DOI: 10.1128/AEM.02752-17
48. Wirth NT, Kozaeva E, Nikel PI. Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI-mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. *Microb Biotechnol*. 2020;13(1):233-249. DOI: 10.1111/1751-7915.13396
49. Huang H, Zheng G, Jiang W, Hu H, Lu Y. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(4):231-243. DOI: 10.1093/abbs/gmv007
50. Chen W, Zhang Y, Yeo WS, Bae T, Ji Q. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *J Am Chem Soc*. 2017;139(10):3790-3795. DOI: 10.1021/jacs.6b13317
51. Sun B, Yang J, Yang S, Ye RD, Chen D, Jiang Y. A CRISPR-Cpf1-Assisted Non-Homologous End Joining Genome Editing System of *Mycobacterium smegmatis*. *Biotechnol J*. 2018;13(9):e1700588. DOI: 10.1002/biot.201700588

52. Tong Y, Charusanti P, Zhang L, Weber T, Lee SY. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth Biol.* 2015;4(9):1020-1029. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00038
53. Li L, Wei K, Zheng G, Liu X, Chen S, Jiang W, Lu Y. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(18):e00827-18. Published 2018 Aug 31. DOI: 10.1128/AEM.00827-18
54. McGovern S, Baconnais S, Roblin P, Nicolas P, Drevet P, Simonson H, et al. C-terminal region of bacterial Ku controls DNA bridging, DNA threading and recruitment of DNA ligase D for double strand breaks repair. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(10):4785-4806. DOI: 10.1093/nar/gkw149
55. Cho S, Choe D, Lee E, Kim SC, Palsson B, Cho BK. High-Level dCas9 Expression Induces Abnormal Cell Morphology in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol.* 2018;7(4):1085-1094. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00462
56. Jiang Y, Qian F, Yang J, Liu Y, Dong F, Xu C, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun.* 2017;8:15179. DOI: 10.1038/ncomms15179
57. Wasels F, Jean-Marie J, Collas F, López-Contreras AM, Lopes Ferreira N. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*. *J Microbiol Methods.* 2017;140:5-11. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.06.010
58. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759-771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038
59. Hong W, Zhang J, Cui G, Wang L, Wang Y. Multiplexed CRISPR-Cpf1-Mediated Genome Editing in *Clostridium difficile* toward the Understanding of Pathogenesis of *C. difficile* Infection. *ACS Synth Biol.* 2018;7(6):1588-1600. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00087
60. Yan MY, Yan HQ, Ren GX, Zhao JP, Guo XP, Sun YC. CRISPR-Cas12a-Assisted Recombineering in Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(17):e00947-17. DOI: 10.1128/AEM.00947-17
61. Komor AC, Badran AH, Liu DR. Editing the Genome Without Double-Stranded DNA Breaks. *ACS Chem Biol.* 2018;13(2):383-388. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00710
62. Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H, Kondo A. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol.* 2018;3(4):423-429. DOI: 10.1038/s41564-017-0102-6
63. Chen W, Zhang Y, Zhang Y, Pi Y, Gu T, Song L, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species. *iScience.* 2018;6:222-231. DOI: 10.1016/j.isci.2018.07.024
64. Wang Y, Wang S, Chen W, Song L, Zhang Y, Shen Z, et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Assisted Cytidine Deaminase Enable Precise and Efficient Genome Editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(23):e01834-18. DOI: 10.1128/AEM.01834-18
65. Li Q, Seys FM, Minton NP, Yang J, Jiang Y, Jiang W, Yang S. CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted base editing in the solvent producer *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116(6):1475-1483. DOI: 10.1002/bit.26949
66. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:172. DOI: 10.1186/1471-2105-8-172
67. Hidalgo-Cantabrana C, Goh YJ, Barrangou R. Characterization and Repurposing of Type I and Type II CRISPR-Cas Systems in Bacteria. *J Mol Biol.* 2019;431(1):21-33. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.09.013
68. So Y, Park SY, Park EH, et al. A Highly Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Large Genomic Deletion in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol.* 2017;8:1167. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01167
69. Mougias I, Bosma EF, Weenink K, Vossen E, Goijvaerts K, van der Oost J, van Kranenburg R. Efficient Genome Editing of a Facultative Thermophile Using Mesophilic spCas9. *ACS Synth Biol.* 2017;6(5):849-861. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00339
70. Li K, Cai D, Wang Z, He Z, Chen S. Development of an Efficient Genome Editing Tool in *Bacillus licheniformis* Using CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(6):e02608-17. DOI: 10.1128/AEM.02608-17
71. Li Q, Chen J, Minton NP, Zhang Y, Wen Z, Liu J, Yang H, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol J.* 2016;11(7):961-972. DOI: 10.1002/biot.201600053
72. Xu T, Li Y, Shi Z, Hemme CL, Li Y, Zhu Y, et al. Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(13):4423-4431. DOI: 10.1128/AEM.00873-15
73. McAllister KN, Bouillaut L, Kahn JN, Self WT, Sorg JA. Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis. *Sci Rep.* 2017;7(1):14672. Published 2017 Nov 7. DOI: 10.1038/s41598-017-15236-5
74. Wang S, Hong W, Dong S, Zhang ZT, Zhang J, Wang L, Wang Y. Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(10):1095-1099. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.03.026
75. Zhang J, Yang F, Yang Y, Jiang Y, Huo YX. Optimizing a CRISPR-Cpf1-based genome engineering system for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):60. DOI: 10.1186/s12934-019-1109-x
76. Li Y, Lin Z, Huang C, Zhang Y, Wang Z, Tang YJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metab Eng.* 2015;31:13-21. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.06.006
77. Standage-Beier K, Zhang Q, Wang X. Targeted Large-Scale Deletion of Bacterial Genomes Using CRISPR-Nickases. *ACS Synth Biol.* 2015;4(117):1217-1225. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00132
78. Wu Y, Hao Y, Wei X, Shen Q, Ding X, Wang L, et al. Impairment of NADH dehydrogenase and regulation of anaerobic metabolism by the small RNA RyhB and NadE for improved biohydrogen production in *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:248. DOI: 10.1186/s13068-017-0938-2
79. Huang H, Song X, Yang S. Development of a RecE/T-assisted CRISPR-Cas9 toolbox for *Lactobacillus*. *Biotechnol J.* 2019;14(7):e1800690. DOI: 10.1002/biot.201800690
80. Song X, Huang H, Xiong Z, Ai L, Yang S. Erratum for Song et al. CRISPR-Cas9D10A Nickase-Assisted Genome Editing in *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(6):e00146-18. DOI: 10.1128/AEM.00146-18
81. Guo T, Xin Y, Zhang Y, Gu X, Kong J. A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):22. DOI: 10.1186/s12934-019-1075-3
82. Oh JH, van Pijkeren JP. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(17):e131. DOI: 10.1093/nar/gku623
83. Tapscott T, Guarnieri MT, Henard CA. Development of a CRISPR/Cas9 system for *Methylococcus capsulatus in vivo* gene editing. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(11):e00340-19. Published 2019 May 16. DOI: 10.1128/AEM.00340-19
84. Sun J, Wang Q, Jiang Y, Wen Z, Yang L, Wu J, Yang S. Genome editing and transcriptional repression in *Pseudomonas putida* KT2440 via the type II CRISPR system. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):41. DOI: 10.1186/s12934-018-0887-x
85. Cobb RE, Wang Y, Zhao H. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol.* 2015;4(6):723-728. DOI: 10.1021/sb500351f
86. Penewit K, Holmes EA, McLean K, Ren M, Waalkes A, Salipante SJ. Efficient and scalable precision genome editing in *Staphylococcus aureus* through conditional recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counterselection. *mBio.* 2018;9(1):e00067-18. DOI: 10.1128/mBio.00067-18 [published correction appears in *mBio.* 2018 Oct 2;9(5):e01839-18. DOI: 10.1128/mBio.01839-18] [published correction appears in *mBio.* 2019 Jan 15;10(1):e02698-18. DOI: 10.1128/mBio.02698-18].

#### Информация об авторах:

Блатов Игорь Александрович, инженер ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: iblatov@bk.ru

Щурова Анастасия Сергеевна, инженер ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: schurova.nastya@yandex.ru

Гущин Дмитрий Юрьевич, старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: albanec2@gmail.com

Зверева Светлана Дмитриевна, старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: sv.zvereva.2014@gmail.com

#### Information about authors:

Igor A. Blatov, engineer, Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: iblatov@bk.ru

Anastasia S. Shchurova, engineer, Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: schurova.nastya@yandex.ru

Dmitry Yu. Guschin, senior researcher, Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: albanec2@gmail.com

Svetlana D. Zvereva, senior researcher, t Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: sv.zvereva.2014@gmail.com

## НОВОСТИ НАУКИ

### Новые эффективные вакцины против болезни Лайма

Болезнь Лайма вызывается *Borrelia burgdorferi*, бактерией, передающейся через укус зараженного клеща. Единственной профилактической мерой, доступной в настоящее время людям, является «руководство» по предотвращению укусов клещей. Неэффективность этой стратегии подтверждается оценкой 300 000 диагностированных случаев болезни Лайма, которые происходят ежегодно в Соединенных Штатах, наряду с более чем 100 000 в Европе.

Ранняя диагностика и лечение могут бороться с инфекцией, однако, если ее не лечить, возрастает риск того, что инфекция может распространиться на суставы, сердце и нервную систему. Даже те, кто был успешно диагностирован и вылечен, могут быть повторно инфицированы, если укушены снова. Авторы этого нового документа использовали обсуждения на совещании в Центре Банбери для определения наиболее перспективных новых стратегий противодействия инфекции. «Мы можем представить разработку стратегий гибридных вакцин, направленных как на микроба-нарушителя, так и на его переносчика клещей для предотвращения болезни Лайма», – сказала доктор Мария Гомес-Солецки, ведущий автор статьи и исследователь Университета Теннесси. «Это двусторонний подход». В дополнение к описанию новых научных подходов авторы рассматривают социальные последствия новой вакцины. «Вакцинация от болезни Лайма – это личный выбор человека», – отмечают авторы. «Концепция личной иммунизации против незаразной болезни против широко распространенной вакцинации для предотвращения распространения заразной инфекции должна быть частью общественного просвещения и обсуждения». Доктор Ребекка Лешан, исполнительный директор Центра Банбери, отмечает, что предыдущее совещание по усовершенствованной диагностике уже имело серьезные последствия с одобрением FDA ряда тестов, которые вносят ясность в поле. По ее словам, результаты последних встреч продолжают определять правильный курс действий.



*New effective vaccines for Lyme disease are coming – Outbreak News Today [Electronic resource].  
URL: <http://outbreaknewstoday.com/new-effective-vaccines-for-lyme-disease-are-coming-82130/>*

# Молекулярно-генетические методы изучения биопленок микроорганизмов

Е.В.Детушева, П.В.Слукин, Н.К.Фурсова

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

Обзорная статья содержит сведения о клинической значимости биопленок микроорганизмов и основных современных молекулярно-генетических методах, применяемых для изучения микробных биопленок: сравнительное изучение геномов, транскриптомов и протеомов планктонных клеток и клеток в составе биопленок; генетический контроль продукции внеклеточного матрикса биопленок; анализ вклада отдельных генов и кластеров генов в формирование фенотипа биопленкообразования; идентификация видов микроорганизмов в полимикробных биопленках.

**Ключевые слова:** биопленки микроорганизмов, молекулярно-генетические методы, геном, транскриптом, протеом, видовая идентификация микроорганизмов

**Для цитирования:** Детушева Е.В., Слукин П.В., Фурсова Н.К. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок микроорганизмов. Бактериология. 2020; 5(2): 49–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-49-55

## Molecular-genetic methods for studying microbial biofilms

E.V.Detusheva, P.V.Slugin, N.K.Fursova

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

The review article contains information on the clinical significance of microbial biofilms and the main modern molecular genetic methods used to study microbial biofilms: comparative study of genome, transcriptome and proteome of planktonic cells and biofilms; genetic control of biofilm extracellular matrix production; analysis of the contribution of individual genes and gene clusters to the formation of the biofilm phenotype; identification of microorganism species in polymicrobial biofilms.

**Key words:** microbial biofilms, molecular genetic methods, genome, transcriptome, proteome, microbial species identification

**For citation:** Detusheva E.V., Slugin P.V., Fursova N.K. Molecular-genetic methods for studying microbial biofilms. Bacteriology. 2020; 5(2): 49–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-49-55

**Б**иопленки представляют собой сообщества агрегированных клеток микроорганизмов, окруженных внеклеточным полимерным матриксом и прикрепленных к абиотической или биотической поверхности. Биопленки считаются одним из наиболее широко распространенных и успешных способов организации микробной жизни на Земле в большинстве природных экологических ниш [1]. По данным Национального института здоровья (НИИ) США, около 80% бактериальных инфекций человека ассоциированы с микробными биопленками и с трудом поддаются лечению [2]. Кроме того, многие бактерии-комменсалы человека, входящие в состав кишечной микрофлоры, носоглотки и других сайтов тела, существуют в виде биопленок [3]. Способность к биопленкообразованию относят к числу факторов вирулентности микроорганизмов, позволяющих им успешно

колонизировать организм хозяина. Это свойство характерно, в том числе, для группы патогенов, представляющих в настоящее время главную угрозу здоровью людей из-за распространения среди них мультирезистентных штаммов: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. и *Salmonella* spp. [4].

По морфологии и биологическим характеристикам микроорганизмы в биопленке существенно отличаются от планктонных клеток. Трехмерная структура биопленки представляет собой естественный барьер, защищающий микроорганизмы, поэтому неподвижные клетки, окруженные внеклеточным матриксом, более устойчивы к экстремальным условиям окружающей среды по сравнению с планктонными клетками [5]. Важное различие между двумя образами

### Для корреспонденции:

Детушева Елена Владимировна, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 2.

Телефон: (4967) 36-0079

E-mail: DetushevaEV@obolensk.org

Статья поступила 30.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Elena V. Detusheva, researcher of laboratory antimicrobial agents of department molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор.

Address: 2 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0079

E-mail: DetushevaEV@obolensk.org

The article was received 30.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

жизни заключается в том, что планктонные клетки и клетки биопленки не имеют одинаковых транскриптомов или протеомов. Возможно, наиболее заметным фенотипическим различием между биопленками и планктонными клетками является тот факт, что клетки биопленок гораздо менее восприимчивы к внешним воздействиям, чем их генетически идентичные планктонные аналоги. В частности, биопленки обладают высокой толерантностью и устойчивостью к антимикробным препаратам, что осложняет выбор адекватной антибиотикотерапии инфекций, ассоциированных с биопленками. Толерантность к антибиотикам, как правило, является временным и ненаследуемым фенотипом микробных клеток, а устойчивость – это приобретенное и наследуемое свойство микроорганизмов [6]. Толерантность и резистентность к антибактериальным препаратам обеспечиваются у биопленок несколькими молекулярными механизмами: наличием физического барьера в виде межклеточного матрикса, затрудняющего проникновение антибиотиков [7]; наличием субпопуляций микробных клеток с пониженной метаболической активностью [8]; увеличением среднего числа на микробную клетку копий плазмид, несущих гены антибиотикорезистентности, и увеличением транскрипции этих генов [9]; повышенным уровнем горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности и частоты мутаций этих генов [10, 11], активацией эффлюксных насосов клеток [12].

Исследование структуры и функций биопленок требует использования микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических и других методов (таблица).

#### **Выявление генетических структур, участвующих в биопленкообразовании**

Для идентификации генетических структур, контролирующей свойство биопленкообразования, были широко использованы молекулярно-генетические методы детекции генов и корреляция их наличия с фенотипом формирования биопленки. Например, скрининг генов *ALS2*, *LIP1*, *LIP4* и *APT1-4* *Candida tropicalis* показал их роль в формировании биопленки, поскольку они кодируют свойства адгезии и секрецию аспартил-протеиназ и фосфолипаз, участвующих в прикреплении к поверхностям. Выявленные в генах однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), а также инсерции и делеции коррелировали с разными фенотипами биопленкообразования. Некоторые делеции приводили к полной утрате способности к адгезии и образованию биопленок [13]. Методом делеционных мутантов установлена роль оперона *dltABCD*, кодирующего белки внешних мембран, для формирования биопленок и толерантности к антибиотикам у *Streptococcus mutans*, *S. aureus* и *Enterococcus faecalis* [14].

Визуализация расположения бактериальных клеток в биопленках была продемонстрирована с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Наличие редкого возбудителя *Aerococcus urinae* было обнаружено этим методом в сердечных клапанах при эндокардите, при этом микробиологически возбудитель не был детектирован [15].

Подтверждение взаимосвязи геномов с фенотипическими признаками было продемонстрировано на примере трудно культивируемых бактерий *Fusobacterium nucleatum*, которые являются ключевым членом биопленки ротовой полости человека. Выявлены штаммы *F. nucleatum* с дефек-

тами образования биопленки, которые имели мутации в генах белков *FtsX* и *EnvC*, контролирующих клеточное деление, и белка *RnfA*, участвующего в транспорте электронов. Методом транспозонного мутагенеза и делеционных мутантов показана роль генов *ftsX* или *envC* в формировании биопленки нормального вида или в виде нитчатых структур [16].

При изучении биопленок *Salmonella* сероваров Typhimurium, Virchow, Enteritidis и Montevideo продемонстрировано влияние генов *dam* и *seqA*, контролирующих метилирование и репликацию ДНК, на образование биопленки. У делеционных мутантов по этим генам в экспериментах по одноэтапной Lambda red-рекомбинации была восстановлена способность к формированию биопленок и пелликул [17].

Интересные результаты получены в работе Hazan et al. (2016), которые с помощью делеционных мутантов по генам системы кворума продемонстрировали взаимосвязь механизма кворума клеток (QS) в биопленке *P. aeruginosa* с механизмом переноса электронов в дыхательной цепи и автолизом клеток. По мнению авторов, это демонстрирует сходство с начальным митохондриально-опосредованным этапом апоптоза у эукариот [18].

#### **Метагеномные и полногеномные методы исследования**

Изучение полных геномов возбудителей инфекционных заболеваний позволило расширить понимание молекулярно-генетических механизмов формирования фенотипов антибиотикорезистентности и биопленкообразования. При использовании метагеномного анализа удалось выявить многокомпонентность биопленок ротовой полости человека [19]. При изучении полного генома возбудителя язвенной инфекции стопы *P. aeruginosa*, который характеризовался сильно выраженной способностью к биопленкообразованию, были идентифицированы гены антибиотикорезистентности (*aph*, *blaOXA*, *blaPAO*, *fosA*, *catB*, *tetG*), а также гены, кодирующие эффлюксные насосы *MexAB*, *MexC* и *MexD* [20].

Полногеномное исследование биопленок *Bacillus cereus* с использованием транспозонного мутагенеза показало важность 23 генов для формирования фенотипа биопленок. Основываясь на предсказании функций этих генов, они контролируют биосинтез нуклеотидов, утилизацию железа, продукцию антибиотиков, синтез АТФ-зависимой протеазы и регуляторов транскрипции [21].

#### **Транскриптомы биопленок**

В третью группу экспериментальных подходов входят методы оценки транскриптома бактерий, позволяющие выявить активные (экспрессируемые) участки геномов в планктонных клетках и в биопленках. Показано, что субпопуляции бактерий в биопленках физиологически неоднородны, что затрудняет изучение биопленок, поскольку многие экспериментальные процедуры, такие как, например, тестирование на чувствительность и транскриптомное профилирование, оценивают биопленку в целом, а не отдельные группы клеток. Еще одно важное различие планктонных клеток и биопленок состоит в том, что их транскриптомы и протеомы существенно различаются, что отражается в фенотипических различиях между этими двумя формами существования бактерий [22].

Таблица. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок		
Наименование метода	Основные результаты	Автор, год, ссылка
<i>Выявление генетических структур, участвующих в биопленкообразовании</i>		
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим секвенированием наработанного фрагмента ДНК	Скрининг гена ALS2 в 68 изолятах <i>C. tropicalis</i> показал, что делеции в областях 1697-1925 и 2073-2272 коррелируют с низкой способностью образовывать биопленку	Zhang L.J., 2019 [13]
Метод делеционных мутантов	Установлена роль оперона <i>dltABCD</i> , кодирующего белки внешних мембран, для формирования биопленок и толерантности к гентамицину, ванкомицину, колистину и полимиксину <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> и <i>E. faecalis</i> . Показана зависимость регуляции экспрессии оперона <i>dltABCD</i> в биопленках <i>S. mutans</i> от двухкомпонентной системы CiarH	Nilsson M., 2019 [14]
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) для визуализации локализации клеток в биопленке	На эндокардиальном клапане с помощью олигонуклеотидного зонда к неспецифическому участку гена 16S рРНК было визуализировано расположение биопленки, а с помощью специфического зонда определено присутствие в биопленке <i>A. urinae</i>	Yaban B., 2020 [15]
Транспозонный мутагенез <i>F. nucleatum</i> , введение с помощью плазмиды в хромосому бактерий мобильных генетических элементов – транспозонов, культивирование биопленки, отбор клонов с измененным фенотипом биопленки, локализация мутации	Выявлены штаммы <i>F. nucleatum</i> с дефектами образования биопленки, которые имели мутации в генах белков клеточного деления <i>FtsX</i> и <i>EnvC</i> , гене белка транспорта электронов <i>RnfA</i> , а также в генах белков с неидентифицированными функциями. Мутанты <i>F. nucleatum</i> с делециями генов <i>ftsX</i> или <i>envC</i> характеризовались продукцией биопленки в виде нитчатых структур, которые сохраняли способность к адгезии. Выдвинуто предположение, что роль генов <i>ftsX</i> и <i>envC</i> заключается в формировании пространственной структуры биопленки	Wu C.A., 2018 [16]
Получение мутантов <i>Salmonella</i> сероваров методом одноэтапной Lambda red-рекомбинации, комплементация поврежденных генов методом генетической трансформации	Мутанты <i>Salmonella</i> сероваров Typhimurium, Virchow, Enteritidis и Montevideo по генам <i>dam</i> и <i>seqA</i> имели сниженную способность формировать биопленку на полистироле и не способны были образовать пелликулу в жидкой среде. Полноценные гены <i>dam</i> и <i>seqA</i> , клонированные в векторе pBAD24 и введенные в мутантные клетки методом трансформации, восстанавливали способность продукции биопленку и пелликулу	Uğur S., 2018 [17]
Изучение делеционных мутантов <i>P. aeruginosa</i> по гену <i>lasR</i> , регулятору QS и генов оперона <i>pqsABCDL</i> , кодирующего синтез HQNO	Высказана гипотеза о координации механизма кворума клеток (QS) в биопленке <i>P. aeruginosa</i> с механизмом переноса электронов в дыхательной цепи и мембранным потенциалом клеток. Показано, что QS способствует формированию толерантности биопленки к меропенему, вызывая автолиз клеток и выброс внеклеточной ДНК в матрикс биопленки	Hazan R., 2016 [18]
<i>Метагеномные и полногеномные методы исследования</i>		
Метагеномный анализ состава биопленки ротовой полости человека	Метагеномный анализ биопленки из слюны человека продемонстрировал многокомпонентность биопленки с преобладанием <i>Lactobacillus fermentum</i> на ранних стадиях созревания биопленки и <i>Streptococcus</i> – на более поздних.	Edlund A., 2018 [19]
Полногеномное секвенирование по технологии Nano pore, биоинформационный анализ с помощью программы ResFinder ( <a href="https://cge.cbs.dtu.dk">https://cge.cbs.dtu.dk</a> )	Полногеномный анализ возбудителя язвенной инфекции стопы <i>P. aeruginosa</i> , сильного продуцента биопленки, выявил в его геноме детерминанты антибиотикорезистентности ( <i>aph</i> , <i>blaOXA</i> , <i>blaPAO</i> , <i>fosA</i> , <i>catB</i> , <i>tetG</i> ), гены эффлюксных насосов MexAB, MexC and MexD; генетические детерминанты вторичных метаболитов, гомосерин-лактона, бактериоцинов, феназина, бета-лактона, пиоцианина, пиохелина, пирролизиксенамида и танамицина	Srivastava P., 2020 [20]
Изучение полных геномов вариантов штаммов <i>B. cereus</i> , полученных транспозонным мутагенезом	Транспозонный мутагенез <i>B. cereus</i> показал, что штаммы, дефектные по образованию биопленки, имели мутации в генах <i>clpY</i> , <i>spollAD</i> , <i>comER</i> , <i>purD</i> , <i>soj</i> , <i>glgB</i> , <i>purH</i> , <i>fluB</i> , <i>modA</i> , <i>pepP</i> , <i>brnQ</i> , <i>cwlD</i> , <i>ywbE</i> , а также еще в 10 участках генома, выполняющих различные функции	Yan F., 2017 [21]
<i>Транскриптомные биопленок</i>		
Транскриптомный анализ с помощью РНК-секвенирования (RNA-seq), геномный анализ штаммов <i>B. cereus</i> на возможность биопленкообразования	Идентифицированы 23 гена <i>B. cereus</i> , повреждение которых в результате инсерции транспозона приводило к изменению фенотипа биопленкообразования. Эти гены контролировали биосинтез нуклеотидов, утилизацию железа, продукцию антибиотиков, АТФ-зависимых протеаз и транскрипционных регуляторов. В ходе транскрипционного анализа идентифицировано 500 генов, экспрессия которых отличается в планктонных клетках и в биопленках	Yan F., 2017 [21]
Получение мутантных штаммов <i>S. aureus</i> по гену <i>mgrA</i> , сравнительный анализ изогенных штаммов, выделение тотальной мРНК, синтез кДНК, количественная ПЦР в реальном времени	Изучены регуляторные механизмы, контролирующие экспрессию оперона <i>psm</i> , кодирующего амфипатические пептиды, продуцируемые <i>S. aureus</i> при формировании биопленки. Показано, что белок MgrA специфично связывается с промоторным регионом оперона <i>psm</i> . Показано, что формирование биопленки и ее распространение существенно снижается у мутантов по гену <i>mgrA</i> . Белок MgrA является негативным регулятором оперона <i>psm</i> , который репрессирует его транскрипцию	Jiang Q., 2017 [23]
Выделение ДНК и РНК из биопленок, синтез кДНК, определение копий плазмид, qRT-PCR, индукция планктонных клеток и клеток биопленок, проточная цитометрия, флуоресцентно-активированный клеточный сортинг (FACS), анализ генома единичной клетки	Продемонстрировано повышенное увеличение копий плазмиды pCF10 в биопленке <i>E. faecalis</i> , повышенная транскрипция генов антибиотикорезистентности, локализованная на этих плаزمиде, что было характерно для субпопуляции клеток биопленки. Данное свойство утрачивалось при переходе клеток в планктонное состояние	Cook L.C., 2013 [24]
Молекулярное клонирование генов <i>acrA</i> и <i>acrB</i> , получение делеционных мутантов, <i>in silico</i> анализ, секвенирование РНК, анализ экспрессии мРНК, получение продуцентов и очистка рекомбинантных продуктов	Показано, что экспрессия генов <i>acrA/B</i> была снижена у делеционного мутанта по гену <i>anoR</i> системы QS. Установлено наличие AcrR-связывающего мотива в промоторной области гена <i>anol</i> , кодирующего N-ацил-гомосерин-лактон-синтазу, и гена регулятора <i>anoR</i> . Продемонстрирована транскрипционная регуляция системы QS продуктом AcrR. Эффлюксный насос AcrAB играет важную роль в формировании биопленок и антибиотикорезистентности	Subhadra B., 2020 [25]

Таблица. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок (окончание)		
Метод ДНК-микрочипов, иммунопреципитации и делеционных мутантов	Показано, что BrIR (biofilm resistance locus regulator) является прямым активатором транскрипции эффлюксных насосов семейства RND (resistance-nodulation-division), кодируемых оперонами <i>mexAB-oprM</i> и <i>mexEF-oprN</i>	Liao J., 2013 [26]
Анализ транскриптов делеционных мутантов по гену <i>ndvB</i> и клеток дикого типа <i>P. aeruginosa</i>	Изучен продукт гена <i>ndvB</i> в биопленках <i>P. aeruginosa</i> , обеспечивающий устойчивость к тобрамицину. Транскрипты гена <i>ndvB</i> были представлены в биопленках в 20 раз выше, чем в планктонных клетках. Показано, что циклические глюканы, производные NdvB, могут играть роль в передаче сигналов между клетками в биопленках. Путь окисления этанола представлен как новый механизм резистентности к антибиотикам, специфичный для биопленок, который ранее не был описан	Beaudoin T., 2012 [27]
Метранскриптомный анализ с использованием секвенирования эволюционно консервативных генов	Количество генов, экспрессируемых в биопленке, различалось на разных стадиях роста биопленки. Изучена динамика изменений передачи межклеточных сигналов, поглощения железа, реакции на изменение pH. Описаны ранее неизвестные функции патогена <i>L. fermentum</i> , вызывающего тяжелые формы кариеса, связанные со способностью выживать при низких значениях pH	Edlund A., 2018 [19]
Транскриптомный анализ штамма <i>B. cereus</i> и его мутантов, полученных с помощью транспозонного мутагенеза	Выявлены 500 генов, которые дифференциально экспрессировались в клетках при формировании биопленки, в том числе гены, вовлеченные в биосинтез пурина <i>pur</i> , ген <i>aad</i> , кодирующий бифункциональную алкоголь/альдегид дегидрогеназу. В условиях индукции биопленкообразования с помощью глицерин-MnSO <sub>4</sub> экспрессия 350 генов увеличивалась, а 140 генов – уменьшалась	Yan F, 2017 [21]
<i>Протеомы биопленок</i>		
Биоинформационный анализ, мутационный анализ, филогенетический анализ штаммов <i>S. aureus</i> и <i>S. epidermidis</i>	Описана классификация белков семейства CWA <i>S. aureus</i> – их структура, биологическая функция, связь с формированием биопленки <i>S. epidermidis</i> и возможная роль в качестве терапевтических мишеней для разработки иммунотерапевтических методов лечения для предотвращения инфекций, вызываемых <i>S. epidermidis</i>	Ortega-Pe a S., 2020 [28]
Атомно-силовая микроскопия, биоинформационный анализ, мутационный анализ, филогенетический анализ, метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса природных штаммов <i>P. fluorescens</i>	Показана роль в образовании и рассеивании биопленок белка LapA массой 520 кДа, экспонированного на поверхности клетки, который представляет собой документально подтвержденный адгезин. LapA кодируется в составе кластера генов системы секреции T1SS и регуляторных белков либо независимо от этого кластера	Collins A.J., 2020 [29]
Биоинформационный анализ, мутационный анализ, филогенетический анализ уropатогенных штаммов <i>E. coli</i>	Описаны белковые субъединицы, из которых состоят функциональные амилоидные волокна, вырабатываемые бактериями и являющиеся важным компонентом внеклеточного матрикса, который защищает клетки от стрессоров окружающей среды. Показано, что функциональные амилоидные волокна (curli), обнаруженные во внеклеточном матриксе <i>E. coli</i> , представляют собой гетерополимеры семейства белков Csg, роль которых в сборке curli заключается в стимулировании или ингибировании агрегации бактериальных клеток	Jain N., 2019 [30]
Биоинформационный анализ, протеомный анализ биопленок <i>P. aeruginosa</i>	Выявлен порин OprF внешней мембраны в матриксе биопленки и в пузырьках внешней мембраны <i>P. aeruginosa</i> . Изучена клеточная структура и роль матричных белков внешней мембраны OprF, LecB и OprA в образовании биопленок и формировании иммунного ответа микроорганизма	Cassin E.K., 2019 [31]
Метод масс-спектрометрии (SWATH-MS), нанопоточная хроматография, жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование клинических изолятов <i>P. aeruginosa</i>	Описаны протеомы 27 клинических изолятов бактерий <i>P. aeruginosa</i> . Профили экспрессии белков регистрировали у изолятов, культивируемых в планктонной и биопленочной форме, с использованием последовательной регистрации всех теоретических фрагментных ионных спектров масс-спектрометрии (SWATH-MS)	Erdmann J., 2019 [32]

Так, в исследовании Yan F et al., 2017, были идентифицированы 23 гена *B. cereus* (контролирующие биосинтез нуклеотидов, утилизацию железа, продукцию антибиотиков, АТФ-зависимых протеаз и транскрипционных регуляторов), повреждение которых инсерцией транспозона приводило к изменению фенотипа биопленкообразования (нитчатые структуры). Кроме того, в ходе транскрипционного анализа идентифицированы 500 генов, экспрессия которых отличалась в планктонных клетках и в биопленках [21]. В другом исследовании при изучении биопленок *S. aureus* была установлена роль белка MgrA как негативного регулятора экспрессии оперона *rsm*, кодирующего амфипатические пептиды, важного не только для формирования биопленок, но и для вирулентности этого патогена. У мутантов по гену *mgrA* была снижена способность к образованию биопленки [23].

Показано, что в процессе образования биопленок в бактериях увеличивалось среднее число копий плазмид и возрастала их гетерогенность. На примере *E. faecalis* было выявлено, что среднее число копий плазмиды pCF10, несущей гены устойчивости к антибиотикам, было увеличено в био-

пленках по сравнению с таковым в планктонных клетках; в присутствии ингибирующих концентраций антибиотиков активировалась транскрипция плазмидно-локализованных генов антибиотикорезистентности [24].

Отмечается, что эффлюксные насосы играют важную роль не только в формировании устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, но и связаны с индукцией процесса образования биопленок. Например, анализ *in silico* показал, что делеция генов, кодирующих широко распространенные среди различных видов бактерий эффлюксные насосы AcrAB, приводила к снижению устойчивости к антибиотикам, и к уменьшению способности к образованию биопленок у *Acinetobacter nosocomialis*. В данной работе установлена взаимосвязь биопленкообразования и системы кворума: белок AпоR, являющийся частью системы QS, был регулятором транскрипции оперона эффлюксного насоса *acrAB* [25].

Было показано, что у *P. aeruginosa* максимальная экспрессия генов эффлюксных насосов *MexAB-OprM* и *MexEF-OprN* была связана с высоким уровнем устойчивости к антибиоти-

кам биопленок и регулировалась активатором транскрипции типа MerR BrIR. Инактивация названных эффлюксных насосов приводила к тому, что биопленки становились более чувствительными к бактериостатическим антибиотикам пяти функциональных классов, сохраняя устойчивость к бактерицидным препаратам [26]. В исследовании Beaudoin et al. (2012) было показано, что ген *ndvB*, кодирующий глюкозилтрансферазу, обеспечивающую устойчивость *P. aeruginosa* к тобрамицину, влиял на экспрессию множества генов в биопленках. Транскрипты гена *ndvB* были в 20 раз более представлены в биопленках, чем в планктонных клетках. Продукт этого гена NdvB, участвующий в цикле окисления этанола, играет важную роль в передаче сигналов между клетками в биопленках. Таким образом, путь окисления этанола представлен как новый механизм резистентности к антибиотикам, специфичный для биопленок [27].

С помощью метагеномного анализа на примере бактериального сообщества биопленок ротовой полости было показано, что изменение состава окружающей среды, в том числе pH, в ряде случаев является триггерным механизмом, запускающим изменение процессов транскрипции генов в клетках биопленок [19]. В другом исследовании были выявлены около 500 генов *B. cereus*, которые дифференциально экспрессировались в условиях индукции биопленкообразования присутствием в среде глицерин-MnSO<sub>4</sub>, при этом экспрессия 350 генов повышалась, 140 генов – уменьшалась. К первой группе генов относились гены, кодирующие небольшие молекулы (этанол, ацетат, лактат, ацетоин и 2,3-бутандиол), биосинтез пуринов, GTP-гомеостаз, нуклеотидный сигналинг ppGpp, циклический c-pp-GMP; стрессовый сигма-фактор SigB; компоненты холин-антихолиновой системы. Ко второй группе были отнесены гены цикла трикарбоновых кислот, кислородного дыхания, биосинтеза жирных кислот и токсинов (гемолизина, энтеротоксина и перфринголизина O) [21].

### Протеомы биопленок

Идентификация молекулярных механизмов биопленкообразования важна с точки зрения выбора конкретных молекул, которые могут быть использованы в качестве мишеней при разработке антибактериальных, антибиопленочных и иммунотерапевтических средств. Методы протеомики направлены на выявление и характеристику таких механизмов и мишеней. Примером такого исследования является работа по изучению белков семейства CWA *S. aureus*, участвующих в начальной адгезии и клеточной агрегации при образовании биопленок, направленного на разработку препаратов против инфекций, вызываемых *S. aureus* и *S. epidermidis* [28]. При изучении формирования биопленок *Pseudomonas fluorescens* была показана важность белка адгезина LapA, локализованного на внешней мембране бактерий, белка LapD, являющегося рецептором сигнальной молекулы c-di-GMP, а также белка LapG, периплазматической протеазы. Белки LapD и LapG совместно контролируют удержание или высвобождение белка LapA с поверхности клетки, что контролируется также сложной сетью ферментов, метаболизирующих c-di-GMP [29].

Важно подчеркнуть, что некоторые белки протеома бактерий функционируют в «изначально неупорядоченном» состоянии (*intrinsically disordered proteins* – IDP), не имеют ста-

бильной структуры, существуют в виде динамического ансамбля конформаций, которые позволяют им функционально взаимодействовать с множеством субстратов. Такое многообразие вносит вклад в различные клеточные биологические процессы, в том числе в биопленкообразование, влияя на переключение метаболизма клеток при переходе от планктонной формы к биопленочной. Конформационная динамика IDP обеспечивает также «расплавление глобул» белков, что приводит к образованию олигомеров и амилоидов. Например, функциональные амилоидные волокна (curli), обнаруженные во внеклеточном матриксе *Escherichia coli*, представляют собой гетерополимеры двух белков, CsgA и CsgB. Создание ингибиторов процесса образования амилоидов рассматривается как одна из наиболее привлекательных стратегий борьбы с биопленками [30].

Белки внеклеточного матрикса *P. aeruginosa* до настоящего времени остаются недостаточно изученными. На сегодняшний день охарактеризованы функции только нескольких белков: CdrA, участвующего в межклеточной адгезии и формировании структуры биопленки, амилоидного белка Fap, обеспечивающего жесткость биопленки, белка LecB, участвующего в построении пространственной структуры биопленки, и матричного белка OprF. В качестве компонента внешней мембраны *P. aeruginosa* белок-порин OprF принимает двойную конформацию и участвует в транспорте веществ, а также в обеспечении целостности клеточной оболочки. Белок OprF, наряду с другими поринами семейства OprA, важен для адгезии бактерий к эукариотическим клеткам-хозяевам, в том числе к альвеолярным эпителиальным клеткам человека, что было подтверждено в экспериментах с изогенными штаммами мутантов по гену *oprF* [31].

При изучении ионных спектров протеомных профилей планктонных клеток и биопленок *P. aeruginosa* методом масс-спектрометрии SWATH-MS были идентифицированы более 1000 белков, которые в разной степени продуцировались неприкрепленными клетками и биопленками. Например, у биопленок существенно выше был уровень продукции белков, участвующих в утилизации железа, передаче сигналов QS, биосинтезе жирных кислот, а также белков внешней мембраны [32].

### Заключение

Развитие молекулярно-генетических методов исследования бактериальных биопленок внесло значительный вклад в понимание процессов, лежащих в основе генетического контроля перехода клеток бактерий из планктонного к биопленочному образу жизни. Выявлены различия в степени биопленкообразования у разных видов микроорганизмов, вовлеченности разных молекулярных механизмов в изменение метаболизма клеток при переходе их одного состояния в другое. Идентифицированы гены и генетические кластеры, участвующие в формировании биопленки, в том числе определяющие изменение самих бактерий и обеспечивающие продукцию внеклеточного матрикса.

Можно выделить три основных методологических подхода, использованных исследователями при изучении феномена биопленкообразования у микроорганизмов: геномный и метагеномный анализ, транскриптомный анализ и анализ

протеомов. Эти подходы взаимно дополняют друг друга, обеспечивая возможность проследить реализацию генетического потенциала микроорганизмов в разных экологических нишах, в том числе в макроорганизме.

Биопленкообразование у микроорганизмов тесно связано с биохимическими клеточными процессами, а особенно четко прослеживается взаимодействие с системой кворума, с внутриклеточным уровнем циклического дигуанозинмонофосфата c-di-GMP, универсальной регуляторной молекулы, участвующей в регуляции подвижности, ориентации в пространстве, адгезии и регуляции генов. Внеклеточный матрикс, как неотъемлемая часть биопленок, представляет собой сложное видоспецифичное образование, включающее в себя не только белковые, но и полисахаридные и полинуклеотидные компоненты. Формирование структуры матрикса биопленки, а также различные фенотипические свойства клеток биопленки регулируются сетью молекулярных переключателей различного уровня, от геномного до молекулярного, одну из ведущих ролей среди которых играют двухкомпонентные системы регуляции бактерий.

Понимание процессов формирования биопленок у микроорганизмов, в первую очередь патогенных и условно-патогенных, а также выработка подходов для предотвращения биопленкообразования представляются важными для обоснованной разработки новых методов и эффективных терапевтических препаратов для лечения инфекций, ассоциированных с образованием биопленок.

#### 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/References

1. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
2. Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Alikhani MY, Shokri Moghadam M, Karampoor S, Kazemi S, et al. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life.* 2020 Jul;72(7):1271-1285. DOI: 10.1002/iub.2266
3. Окулич ВК, Кабанова АА, Плотников ФВ. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ; 2017, 300 с. / Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Mikrobnye bioplenki v klinicheskoi mikrobiologii i antibakterial'noi terapii. Vitebsk, 2017, 300 p. (In Russian).
4. M Campos JC, Antunes LC, Ferreira RB. Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options. *Future Microbiol.* 2020 May;15:649-677. DOI: 10.2217/fmb-2019-0333
5. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3423. DOI: 10.3390/ijms20143423
6. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(5):877-86. DOI: 10.1007/s10096-015-2323-z
7. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol.* 2019;10:913. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00913
8. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 May 1;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010
9. Cook LC, Dunny GM. Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1850-6. DOI: 10.1128/AAC.02010-12
10. Sabaté Brescó M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, et al. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Front Microbiol.* 2017;2(8):1401. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01401
11. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1053-6. DOI: 10.1093/jac/dkn044
12. Subhadra B, Surendran S, Lim BR, Yim JS, Kim DH, Woo K, et al. Regulation of the AcrAB efflux system by the quorum-sensing regulator AnoR in *Acinetobacter nosocomialis*. *J Microbiol.* 2020;58(6):507518. DOI: 10.1007/s12275-020-0185-2
13. Zhang LJ, Yu SB, Li WG, Zhang WZ, Wu Y, Lu JX. Polymorphism analysis of virulence-related genes among *Candida tropicalis* isolates. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(4):446-53. DOI: 10.1097/CM9.000000000000069
14. Nilsson M, Givskov M, Twetman S, Tolker-Nielsen T. Inactivation of the pgmA Gene in *Streptococcus mutans* Significantly Decreases Biofilm-Associated Antimicrobial Tolerance. *Microorganisms.* 2019;7(9):310. DOI: 10.3390/microorganisms7090310
15. Yaban B, Kikhney J, Musci M, et al. *Aerococcus urinae* – a potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231827. DOI: 10.1371/journal.pone.0231827
16. Wu CA, Al Mamun AM, Luong TT, et al. Forward genetic dissection of biofilm development by *Fusobacterium nucleatum*: novel functions of cell division proteins FtsX and EnvC. *mBio.* 2018 Apr 24;9(2):e00360-18. DOI: 10.1128/mBio.00360-18
17. Uğur S, Akçelik N, Yüksel FN, Taşkale Karatuğ N, Akçelik M. Effects of dam and seqA genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Pathog Glob Health.* 2018;112(7):368-77. DOI: 10.1080/20477724.2018.1539803
18. Hazan R, Que YA, Maura D, Strobel B, Majcherczyk PA, Hopper LR, et al. Auto Poisoning of the Respiratory Chain by a Quorum-Sensing-Regulated Molecule Favors Biofilm Formation and Antibiotic Tolerance. *Curr Biol.* 2016;26(2):195-206. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.056
19. Edlund A, Yang Y, Yooseph S, He X, Shi W, McLean JS. Uncovering complex microbiome activities via metatranscriptomics during 24 hours of oral biofilm assembly and maturation. *Microbiome.* 2018;6(1):217. DOI: 10.1186/s40168-018-0591-4
20. Srivastava P, Gomathinayagam S, Easwaran N, Sankar G, Padmavathi E, Shankar M, et al. Comparative data analysis of two multi-drug resistant homoserine lactone and rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* from diabetic foot infected patient. *Data Brief.* 2020 Jul 25;32:106071. DOI: 10.1016/j.dib.2020.106071
21. Yan F, Yu Y, Gozzi K, Chen Y, Guo JH, Chai Y. Genome-wide investigation of biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(13):e00561-00517. DOI: 10.1128/AEM.00561-17
22. Hall CW, Thien-Fah M. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 2017;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010
23. Jiang Q, Jin Z, Sun B. MgrA Negatively regulates biofilm formation and detachment by repressing the expression of psm Operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(16):e01008-e01018. DOI: 10.1128/AEM.01008-18

24. Cook LC, Dunny GM. Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1850-6. DOI: 10.1128/AAC.02010-12.
25. Subhadra B, Surendran S, Lim BR, Yim JS, Kim DH, Woo K, et al. Regulation of the AcrAB efflux system by the quorum-sensing regulator AnoR in *Acinetobacter nosocomialis*. *J Microbiol*. 2020 Jun;58(6):507-518. DOI: 10.1007/s12275-020-0185-2
26. Liao J, Schurr M J, Sauer K. The MerR-like regulator BrIR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2013;195(15):3352-63. DOI: 10.1128/JB.00318-13
27. Beaudoin T, Zhang L, Hinz AJ, Parr CJ, Mah TF. The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2012 Jun;194(12):3128-36. DOI: 10.1128/JB.06178-11
28. Ortega-Peña S, Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC. Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation. *Mol Biol Rep*. 2020 Jan;47(1):771-784. DOI: 10.1007/s11033-019-05139-1
29. Collins AJ, Smith TJ, Sondermann H, O'Toole GA. From Input to Output: The Lap/c-di-GMP Biofilm Regulatory Circuit. *Annu Rev Microbiol*. 2020 Sep 8;74:607-631. DOI: 10.1146/annurev-micro-011520-094214
30. Jain N, Chapman MR. Bacterial functional amyloids: Order from disorder. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2019;1867(10):954-60. DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.05.010
31. Cassin EK, Tseng BS. Pushing beyond the Envelope: the Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. *J Bacteriol*. 2019;201(18):e00050-19. DOI: 10.1128/JB.00050-19
32. Erdmann J, Thöming JG, Pohl S, Pich A, Lenz C, Häussler S. The Core Proteome of Biofilm-Grown Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Cells*. 2019 Sep 23;8(10):1129. DOI: 10.3390/cells8101129

**Информация об авторах:**

Слукин Павел Владимирович, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 2  
Телефон: (4967) 36-0079  
E-mail: Slukin@obolensk.org

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

**Information about co-author:**

Pavel V. Slukin, researcher of laboratory antimicrobial agents of department molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: 2 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279  
Phone: (4967) 36-0079  
E-mail: Slukin@obolensk.org

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biology), leading researcher of laboratory antimicrobial agents of department molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: 2 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279  
Phone: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

**НОВОСТИ НАУКИ****Разрабатывается новый метод повышения безопасности пищевых продуктов**

Преподаватели из Колледжа ветеринарной медицины Канзасского университета разработали более быстрый и эффективный метод обнаружения «шига-токсина *E. coli*», или STEC, в говяжьем фарше.

Традиционный золотой стандарт обнаружения STEC требует выделения и исследования бактерий, не поддается настройкам с высокой пропускной способностью и часто длится недели для получения окончательного результата.

Новый запатентованный Канзасским университетом метод с многоканальной цифровой цепной полимеразной цепной реакцией на основе разделения требует только одного дня для получения подтверждающих результатов.

При попадании в организм через такие продукты, как говяжий фарш и овощи, STEC может вызывать заболевания с такими симптомами, как боль в животе и диарея. Некоторые заболевания, вызванные STEC, могут привести к почечной недостаточности и могут быть опасными для жизни.

Поскольку фекалии крупного рогатого скота и говяжий фарш могут содержать безопасную или менее патогенную кишечную палочку наряду со STEC, наиболее часто используемая полимеразная цепная реакция не может идентифицировать патогенные штаммы кишечной палочки в матрице сложного образца.

Новый цифровой тест полимеразной цепной реакции был разработан для исследований и проверок безопасности пищевых продуктов, которые требуют более короткого цикла обработки и высокой производительности без ущерба для точности обнаружения.



# Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 1

Э.А.Светоч, И.А.Дятлов, Н.Н.Карцев, Б.В.Ерусланов, М.Е.Канашенко, Н.К.Фурсова

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

Шига-токсин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) вызывают тяжелые и опасные для жизни человека заболевания – геморрагический колит (ГК) и ассоциированный с ним гемолитико-уремический синдром (ГУС). Применение антибактериальных этиотропных средств лечения при этих заболеваниях противопоказано. Вакцинные препараты против ГК и ГУС человека отсутствуют. В обзоре представлены материалы по конструированию различных типов кандидатных вакцин против шига-токсин-продуцирующих штаммов *E. coli* и оценке их иммуногенных и протективных свойств в экспериментах на лабораторных и сельскохозяйственных животных. Рассматриваются перспективы использования в практике инактивированных корпускулярных и живых (векторных) вакцин, липополисахаридных, ДНК-вакцин и нановакцин, вакцин на основе бактериальных клеточных оболочек (теней), а также вакцин, создаваемых методами обратной вакцинологии.

**Ключевые слова:** STEC, геморрагический колит, иммунодоминантные антигены, шига-токсины, *EspA*, *EspB*, *Tir*, интимин, *IgG*, *slgA*

**Для цитирования:** Светоч Э.А., Дятлов И.А., Карцев Н.Н., Ерусланов Б.В., Канашенко М.Е., Фурсова Н.К. Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 1. Бактериология. 2020; 5(2): 56–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-56-70

## Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 1

E.A.Svetoch, I.A.Dyatlov, N.N.Kartsev, B.V.Eruslanov, M.E.Kanashenko, N.K.Fursova

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

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains cause serious and life-threatening diseases, hemorrhagic colitis (HC) and associated hemolytic uremic syndrome (HUS). Antibacterial etiotropic therapy against these diseases are not recommended. There are no vaccines against human HA and HUS. The review provides materials on the design of various types of candidate vaccines against STEC strains and assessment of their immunogenic and protective properties in experiments on laboratory and farm animals. The prospects for the use of inactivated corpuscular and live (vector) vaccines, lipopolysaccharide vaccines, DNA vaccines and nanovaccines, vaccines based on bacterial cell membranes (ghost), as well as vaccines created by reverse vaccinology methods in practice are considered.

**Key words:** STEC, hemorrhagic colitis, immunodominant antigens, shiga toxins, *EspA*, *EspB*, *Tir*, intimine, *IgG*, *slgA*

**For citation:** Svetoch E.A., Dyatlov I.A., Kartsev N.N., Eruslanov B.V., Kanashenko M.E., Fursova N.K. Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 1. Bacteriology. 2020; 5(2): 56–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-56-70

Пищевые инфекции, вызываемые шига-токсин-продуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC), являются весьма актуальной проблемой для общественного здравоохранения многих стран мира, включая высокоразвитые [1–3]. Начиная с 1990-х гг. заболевания, обусловленные STEC-штаммами, регистрируются и в Российской

Федерации [4–6]. Шига-токсин-продуцирующие *E. coli* чаще всего вызывают обычную, водянистую диарею, которая протекает в легкой форме, и тяжелые формы болезни – геморрагическую диарею (геморрагический колит (ГК)) и гемолитико-уремический синдром (ГУС). Наибольшую опасность представляет ГУС, при котором у больного раз-

### Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 06.08.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, leader researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 06.08.2020, accepted for publication 15.09.2020

виваются тромбоцитопения, гемолитическая анемия, поражения эпителиальных клеток микрососудов и несостоятельность (почечная недостаточность) выделительной системы. У значительной части пациентов отмечаются нарушения центральной нервной системы (раздражительность, латергия, судороги, ступор, кома и др.). Желудочно-кишечные осложнения в острой стадии ГУС проявляются в виде перфорации желудка, некроза и панкреатита. Особенно болезнь опасна для детей и лиц пожилого возраста. Смертность при развившемся ГУС составляет 5–15% [7]. Использование этиотропных средств для лечения ГК и ГУС противопоказано, поскольку их применение вызывает лизис клеток STEC в кишечнике человека и, как следствие, дополнительный выброс шига-токсинов в кровеносную систему, который усугубляет тем самым течение патологического процесса у больного. Кроме того, антибиотики могут индуцировать переход умеренного бактериофага, несущего в своем геноме гены шига-токсинов, из неактивной фазы (фаг интегрирован в хромосоме) в литическую, что также может способствовать накоплению шига-токсинов в организме больного. Поэтому лечение ГУС является всего лишь поддерживающим, симптоматическим и предполагает контроль у больного баланса жидкости и электролитов. К сожалению, сейчас отсутствуют методические подходы, которые могли бы предотвратить развитие ГУС у инфицированных детей [7].

Шига-токсин-продуцирующие *E. coli* включают в себя группу энтерогеморрагических штаммов (ЕНЕС), для которых характерны наличие в геноме генов синтеза шига-токсинов двух типов, Stx1 и Stx2, интимина (*Eae*), энтерогемолизина (*Ehx*) и других факторов вирулентности, и группу не-ЕНЕС эшерихий, в геноме которых отсутствуют гены синтеза интимина (*eae*-гены) и энтерогемолизина (*ehx*-гены). Классическим представителем ЕНЕС-группы является серотип *E. coli* O157:H7, наиболее опасный патоген, с которым связаны крупные вспышки пищевых инфекций, зарегистрированные в разное время в Японии, США, Англии, Германии и др. странах. В эти эпидемические вспышки были вовлечены сотни и тысячи человек, во всех случаях среди больных ГУС отмечалась гибель [1–3, 7].

Кроме серотипа *E. coli* O157:H7, спорадические и вспышечные случаи ГК могут вызвать *E. coli* других серогрупп, среди которых наиболее часто встречаются серогруппы O26, O55, O103, O111, O121 и O145. *E. coli* указанных серогрупп вызывают менее тяжелые формы болезни, однако обусловленные ими ГК и ГУС также могут сопровождаться гибелью больных [8, 9]. В настоящее время специалисты отмечают увеличивающуюся эпидемиологическую значимость указанных выше серогрупп *E. coli*. Эта тенденция делает весьма насущным для эпидемиологической службы постоянный мониторинг этиологической структуры ГК и ГУС в Российской Федерации.

Представителем не-ЕНЕС шига-токсин-продуцирующих *E. coli* является новый гибридный высокопатогенный и опасный для человека, резистентный ко многим антибиотикам, штамм серотипа O104:H4, вызвавший в 2011 г. в Германии крупную эпидемическую вспышку, охватившую более 4000 человек, сопровождавшуюся развитием у больных тяжелых форм ГУС [10, 11]. При этой вспышке от ГУС погибли

54 человека. Столь тяжелые последствия вспышки ярко демонстрируют неготовность современной медицины эффективно бороться с пищевой инфекцией, обусловленной шига-токсин-продуцирующими *E. coli*.

Как известно, основным источником STEC-штаммов являются сельскохозяйственные (крупный рогатый скот, свиньи, козы, овцы, птица) и дикие животные [12–14]. В последние годы установлено, что дополнительным естественным резервуаром *E. coli* O157:H7 и *Salmonella* spp. являются сельскохозяйственные растения, такие, например, как салаты, петрушка, укроп, редис и др., в тканях которых возбудитель не только сохраняется, но и размножается [15]. Этим, по всей вероятности, и объясняется факт увеличения в последние годы числа вспышек ГК среди людей после употребления зеленых растений или их семян.

Основные меры борьбы с ГК – это предупреждение носительства животными возбудителей ГК и предупреждение распространения ЕНЕС от животных с фекалиями во внешнюю среду, на молочные, мясные и другие продукты, а также в питьевую воду. Большое значение имеют предпринимаемые меры по деконтаминации пищевого сырья, полуфабрикатов, готовых продуктов и питьевой воды от шига-токсин-продуцирующих эшерихий. К сожалению, перечисленные меры далеко не всегда позволяют предохранить пищевое сырье и продукты питания от обсемененности их STEC культурами, а значит, и предотвратить заражение человека, употреблявшего контаминированную патогеном некачественно приготовленную пищу. Следует отметить низкую заражающую дозу *E. coli* O157:H7 для человека, которая составляет 100–1000 живых клеток [7].

Учитывая эпидемическую значимость и тяжелые последствия пищевой инфекции, вызываемой шига-токсин-продуцирующими штаммами *E. coli*, невозможность применения этиотропных средств для лечения ГК и ГУС, во многих странах мира (США, Канаде, европейских странах, Японии, Аргентине, Китае и некоторых других) активно проводят научные поиски по созданию специфических вакцинных препаратов для профилактики носительства STEC-штаммов сельскохозяйственными животными и для защиты человека от STEC-инфекции. Начиная с 1990-х гг. исследователи разрабатывают самые разные типы вакцин: корпускулярные убитые (бактерины), живые вакцины, вакцины на основе клеточных оболочек (теней), вакцины на основе полисахаридов (ПС) и липополисахаридов (ЛПС), ДНК-вакцины, нановакцины, вакцины, создаваемые на основе методов обратной вакцинологии, и субъединичные рекомбинантные вакцины [16–20].

Поскольку для конструирования большинства перечисленных выше вакцин в качестве иммунодоминантных антигенов в настоящее время используют небольшое число известных факторов патогенности ЕНЕС – адгезины и шига-токсины, ниже мы приводим их краткую характеристику.

Адгезию ЕНЕС-штаммов к эпителию кишечного тракта обеспечивают ряд структурных и секреторных компонентов клетки: группа протеинов системы III типа секреции (Т3SS), пили, фимбрии, жгутики, белки-аутотраспортеры и белки внешней мембраны [21–24]. Среди перечисленных компонентов большое внимание уделяется транслоцирующим и эффекторным протеинам Т3SS, которые обеспечивают ад-

гезию возбудителя к клеткам эпителия слизистой кишечника и одновременно поражают микроворсинки эпителия. Процесс адгезии и поражение микроворсинок известен как феномен «прикрепления и сглаживания» (*attaching and effecting – A/E*). В процессе A/E патоген крепко присоединяется к энтероцитам и вызывает гибель их микроворсинок.

Белки T3SS кодируются генами, локализованными на островке патогенности хромосомы EHEC (~30–35 тыс. п.н.), названном локусом сглаживания энтероцитов (*locus of enterocyte effacement – LEE*). На этом же генетическом локусе находится и ген *eae*, контролирующий синтез интимина – белка внешней мембраны клетки, основного адгезина EHEC [25, 26].

Для конструирования кандидатных вакцин против EHEC-патогенов в подавляющем большинстве случаев используют белки T3SSEspA, EspB, Tir и интимины, играющие ключевую роль в адгезии и колонизации клетками EHEC кишечного тракта человека и животных. Важно заметить, что в сыворотке крови людей, переболевших ГК и ГУС, ко всем перечисленным выше антигенам обнаруживают специфические антитела [27, 28].

Белок EspA – полипептид размером 25кДа, являющийся основным структурным компонентом большой филаментозной органеллы, транзиторно экспрессирующийся на поверхность клеток EHEC. Эта органелла выполняет функцию первичного связывания патогена с мембраной клетки хозяина, образуя между ними своеобразный «мост». По образованному белком EspA «мосту» происходит транслокация эффекторных секреторных белков T3SSEspB и EspD, а также Tir-белка – рецептора для основного адгезина клеток EHEC интимина [27, 29, 30].

Белки EspB (37 кДа) и EspD (39 кДа) – полипептиды, которые обеспечивают формирование в плазматической мембране хозяйской клетки пор (транслоконов), через которые происходит доставка эффекторных белков патогена в цитоплазму эукариотической клетки. Кроме того, полипептид EspB транслоцируется в цитоплазму хозяйской клетки, где выполняет функцию триггера, «спускового крючка» процесса A/E и образования пьедесталоподобной структуры для клетки патогена [27, 29, 30].

Еще один секреторный протеин системы T3SS – Tir-белок (80 кДа), который транслоцируется вначале в цитоплазму эпителиальной клетки хозяина, а затем, после его фосфорилирования протеиназой А, встраивается в мембрану этой клетки и служит, как уже указывалось выше, рецептором для основного адгезина клеток EHEC – интимина. Присоединение интимина к Tir-белку обеспечивает прочную связь клетки патогена с клеткой хозяина. В результате описанных событий происходит образование пьедестала для клетки патогена, что в свою очередь вызывает гибель микроворсинок клеток эпителия, а возможно, и гибель (слищивание) самих клеток эпителия [31].

Интимин (Eae) – протеин (94–97 кДа), экспрессируемый клеткой и локализующийся на поверхности ее внешней мембраны. Интимин играет, как уже отмечалось, ключевую роль во взаимодействии с эукариотической клеткой. Рецептор-связывающая активность интимина с Tir-белком обеспечивается С-концевой последовательностью пептида величиной 280–300 аминокислотных остатков (Int280, Int300), кото-

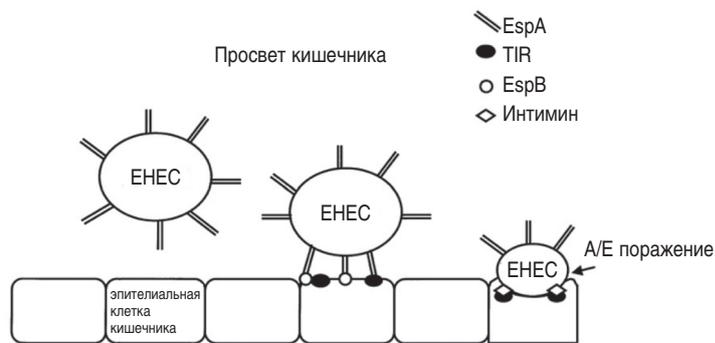


Рис. 1. Диаграмма формирования A/E-поражения кишечного эпителия [27].

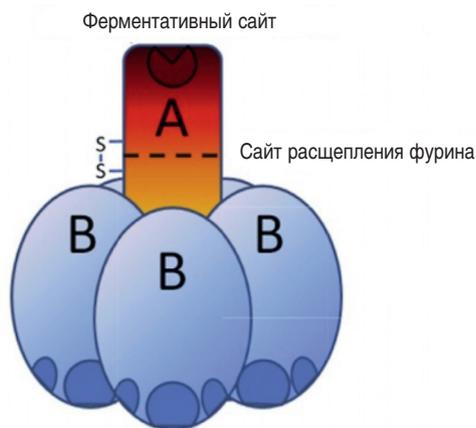
рая, как правило, и используется в качестве антигена при разработке прототипа вакцинных препаратов. По степени гетерогенности С-концевой последовательности на сегодня различают 17 типов интиминов, среди которых интимин-γ1 чаще других ассоциирован с высоковирулентными эпидемическими штаммами EHEC, вызывающими вспышки ГК и ГУС. Именно интимин типа γ1 используют при конструировании вакцин [32]. На рис. 1 представлена модель участия пептидов EspA, EspB, Tir и интимина в формировании поражения эпителия кишечника с помощью механизма A/E.

Вторым целевым патогенетическим фактором STEC-штаммов, против которого должна защищать разрабатываемая вакцина, являются продуцируемые ими шига-токсины. Шига-токсины – это главная причина тяжелых поражений у человека: ГК и потенциально опасного для жизни ГУС.

STEC продуцируют два типа шига-токсинов: шига-токсин типа I (Stx1) и шига-токсин типа II (Stx2). Stx1 практически идентичен Stx *Shigella dysenteriae*, в то время как Stx2 лишь на 60% идентичен Stx1. Антитела против Stx1 не нейтрализуют Stx2 и наоборот. Stx2 в 1000 раз токсичнее шига-токсина Stx1 как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. Важно отметить, что оба шига-токсина, Stx1 и Stx2, имеют по несколько субтипов, незначительно различающихся по антигенной структуре, но существенно различающихся по биологическим свойствам, в частности по видовой специфичности и по степени тяжести вызываемых ими патологий. У людей при тяжелых спорадических случаях и вспышках болезней чаще всего выделяют шига-токсины субтипов Stx2a, Stx2c, реже Stx2d [33–36].

Шига-токсины Stx1 и Stx2 принадлежат семейству AB5-токсинов с молекулярной массой 70 кДа. Они состоят из одной копии энзиматически активной субъединицы А (32 кДа) и пяти субъединиц В (7,7 кДа), каждая из которых несет на себе три связывающих с рецептором сайта (рис. 2).

Рецептором для обоих шига-токсинов является гликолипид глоботриаозилцерамид (Gb3), в большом количестве присутствующий в эндотелии сосудов почек, печени и других органов (рис. 3). Проникая через слизистую кишечника в кровеносное русло, шига-токсины связываются с помощью В-субъединицы с рецептором Gb3 клеток мишеней и посредством N-гликозидазной активности субъединицы А вызывают их гибель. У крупного рогатого скота, основного носителя STEC-штаммов, шига-токсины не вызывают повреждений и гибели клеток кишечного эпителия и других органов, однако



Сайты связывания рецептора Gb3 (всего 15)

Рис. 2. Схема строения шига-токсина (Stx) и шига-подобного токсина, показывающая наличие пяти связывающих (В) субъединиц и одной ферментативной (А) субъединицы [35].

экспериментально показано, что шига-токсины способны супрессировать иммунную систему животных и тем самым увеличивать сроки носительства ЕНЕС или делать его постоянным [37]. Здесь же уместно отметить еще одно важное свойство шига-токсинов: они способствуют колонизации патогеном кишечного тракта, тем самым увеличивая микробную нагрузку на макроорганизм и утяжеляя течение инфекции [38].

Синтез шига-токсинов Stx1 и Stx2 кодируется локусом генов Stx1 и Stx2, локализованных в геноме лямбдоидного умеренного фага, встроенного в хромосому STEC-клеток. Под влиянием различных стресс-факторов, например температуры, антибиотиков, бактериофаг может перейти в литическую фазу и трансдуцироваться в гетерологичные клетки *E. coli* и в клетки других видов энтеробактерий [34, 35]. Учитывая ведущую роль шига-токсинов в патогенезе ГК и ГУС, создание вакцины, способной нейтрализовать их токсическую и колонизационную активность, является, пожалуй, важнейшим критерием успешности будущего вакцинного препарата против STEC-инфекции.

### Корпускулярные инактивированные (убитые) вакцины

Корпускулярные убитые вакцины довольно широко используют в ветеринарной практике для профилактики бакте-

риальных инфекций, в том числе колибактериоза (колидиарии и колисепсиса) у сельскохозяйственных животных. Реже убитые корпускулярные вакцины используют в медицине. Этот тип вакцин, используемый для борьбы с носительством животными ЕНЕС-штаммов серотипа *E. coli* O157:H7, основного возбудителя ГК и ГУС у человека, можно разделить на две группы: вакцины, в которых используют инактивированные интактные клетки *E. coli* O157:H7, и вакцины, в которых применяют генетически модифицированные штаммы *E. coli* O157:H7.

В Российской Федерации для профилактики колибактериоза сельскохозяйственных животных применяют убитую корпускулярную вакцину, в состав которой включены интактные клетки доминирующих в стране патогенных серотипов *E. coli*, включая *E. coli* O157:H7 (поливалентная вакцина). К сожалению, данные о влиянии этой вакцины на носительство животными (крупным рогатым скотом и свиньями) ЕНЕС-штаммов *E. coli* O157:H7 отсутствуют [39]. В то же время в работах Sharma et al. [40] убедительно продемонстрирована эффективность убитой вакцины, приготовленной на основе цельных клеток *E. coli* O157:H7, мутантных по гену *hha*, контролирующему функцию гена *lar*, главного регулятора экспрессии белков Т3SS. Цельные мутантные клетки, введенные бычкам внутримышечно вместе с водно-масляным адъювантом, существенно снижали выделение *E. coli* O157:H7 с фекалиями.

Интересной представляется работа Schaut et al. [41] по вакцинации бычков инактивированной формалином культурой Stx2 негативного, дефектного по *hha*-гену штамма *E. coli* O157:H7. В эксперименте было показано, что внутримышечная иммунизация инактивированными клетками полученного мутанта индуцировала у животных клеточный и гуморальный (сывороточный и мукозальный) иммунные ответы на соматический антиген O157. Важно отметить, что экстракты фекалий иммунизированных животных были способны блокировать адгезию патогена к эпителиальным клеткам кишечника и тем самым контролировать выделение патогена во внешнюю среду. Авторы делают заключение о возможности использования сконструированного ими мутанта *E. coli* O157:H7 в качестве корпускулярной инактивированной вакцины.

### Живые вакцины

Живые аттенуированные вакцины для профилактики STEC-инфекции привлекают исследователей простотой и дешевизной биотехнологического процесса их производства, а также возможностью как перорального, так и парентерального применения. Пероральный способ доставки вакцины особенно важен для индуцирования местного мукозального иммунитета, играющего решающую роль в защите макроорганизма от возбудителей кишечных инфекций. При разработке экспериментальных живых вакцин против ЕНЕС-штамма *E. coli* O157:H7, ведущего возбудителя ГК и ГУС, исследователи использовали как аттенуированные штаммы *E. coli* O157:H7, так и аттенуированные штаммы *Salmonella* и *Mycobacterium bovis* (штамм BCG). Аттенуированные штаммы в данном случае выступают в качестве векторов-носителей протективных антигенов ЕНЕС-штаммов (векторные вакцины).

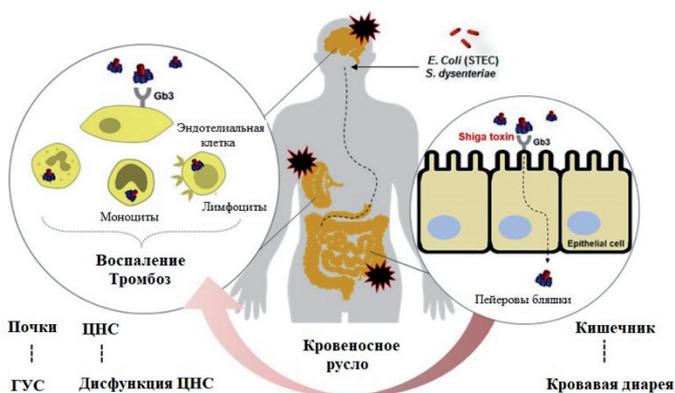


Рис. 3. Пути распространения шига-токсина в организме человека и его поражающее действие на органы-мишени [36].

В 2009 г. Liu et al. [42] с помощью передачи суицидного вектора в клетки *E. coli* O157:H7 получили вариант штамма с делецией *ler*-гена, центрального регулятора генов секреторных белков системы T3SS, отвечающих за A/E-эффект патогена. Путем пассажа на питательной среде из *ler*-варианта *E. coli* O157:H7 был элиминирован профаг с генами синтеза шига-токсинов Stx1 и Stx2. Этот штамм, обозначенный как F25, не продуцировал шигатоксинов и был неvirulentным для мышей BALB/c. Далее в штамм F25 была трансформирована плазида с мутантными генами А-субъединиц шигатоксинов Stx1 и Stx2, кодирующими соответствующие нетоксичные белки обоих токсинов. Полученный штамм *E. coli* O157:H7(F105), так же как и штамм F25, был нетоксичным для Vero-клеток и мышей. Животные, которым внутривенно инъецировали этот штамм, продолжали нормально расти и прибавлять в весе, у них не было отмечено каких-либо признаков болезни. Вакцинированные штаммами F25 и F105 мыши, после их внутривенного заражения virulentным штаммом *E. coli* O157:H7 EDL933, в 55 и 70% случаев соответственно оставались живыми; все контрольные (невакцинированные) мыши после заражения погибли. После интрагастральной вакцинации штаммами F25 и F105 у мышей сформировался мукозальный иммунитет: при пероральном заражении клетками *E. coli* O157:H7 EDL933 у животных отмечали резкое снижение концентрации патогена в кишечном содержимом, все мыши остались живыми; все контрольные (невакцинированные) животные погибли на 4-й день после заражения. Интрагастральная вакцинация штаммами F25 и F105 индуцировала у беременных мышей развитие колострального (пассивного) иммунитета: мышата, родившиеся от вакцинированных матерей, после перорального их заражения штаммом *E. coli* O157:H7 EDL933 выжили в 75 и 83% случаев соответственно; среди контрольных мышат, родившихся от невакцинированных матерей, живыми остались 17%. Авторы работы делают заключение, что сконструированные ими аттенуированные штаммы *E. coli* O157:H7 F25 и F105 могут быть использованы в качестве оральной вакцины против ЕНЕС-штаммов *E. coli* O157:H7.

Gu et al. [43] для защиты мышей BALB/c от *E. coli* O157:H7 EDL933 использовали аттенуированный рекомбинантный штамм *Salmonella*, экспрессирующий слитный белок, состоящий из трех протективных антигенов ЕНЕС: EspA, интимина из 300 (Int300) аминокислот и В-субъединицы шига-токсина Stx2 – Stx2В. Пероральная вакцинация мышей рекомбинантным штаммом *Salmonella* в дозе 1–4 × 10<sup>8</sup> КОЕ индуцировала у животных образование высоких титров сывороточных IgG и в меньшей степени – мукозальных секреторных IgA (sIgA), обнаруживаемых в фекалиях. Иммунизированные мыши на протяжении длительного времени (>70 дней) были защищены от перорального заражения смертельной дозой штамма *E. coli* O157:H7 EDL933. Было показано также, что местный мукозальный иммунитет, индуцированный у мышей рекомбинантной живой вакциной, может быть активирован однократным подкожным введением чистого препарата слитного EspA + Int300 + Stx2В белка даже спустя 70 дней после первичной пероральной иммунизации. Авторы работы считают, что сконструированный ими штамм *Salmonella*, продуцирующий протективные антигены ЕНЕС, является

альтернативой другим типам вакцин, создаваемых для профилактики ЕНЕС-инфекции.

Oliveira et al. [19] сконструировали живую пероральную вакцину на основе аттенуированного штамма *Salmonella typhimurium*, экспрессировавшего основной адгезин ЕНЕС, интимин-γ. Вакцина индуцировала у мышей образование высоких титров специфичных анти-интимин-мукозальных sIgA-антител и подавляла колонизационную активность патогена: у иммунизированных животных после перорального заражения штамм *E. coli* O157:H7 быстрее элиминировался из кишечника по сравнению с контрольными (неиммунизированными) мышами. Авторы считают, что описанная ими живая рекомбинантная вакцина может быть с успехом использована для снижения носительства ЕНЕС-штаммов у животных.

Fujii et al. [44] в качестве векторной живой вакцины против шига-токсин-продуцирующих *E. coli* применили сконструированный ими рекомбинантный штамм *M. bovis* (BCG), продуцирующий протективный антиген В-субъединицы шига-токсина Stx2. Двукратная интраперитонеальная иммунизация этим штаммом мышей BALB/c в дозе 10<sup>7</sup> КОЕ индуцировала у животных высокие титры специфических (анти-Stx2) сывороточных IgG- и мукозальных sIgA-антител. Иммунизированные живой вакциной в дозах 10<sup>7</sup> и 10<sup>6</sup> КОЕ мыши в 57 и 63% соответственно остались живыми после перорального заражения их смертельной дозой шига-токсин-продуцирующего (Stx2d) штамма *E. coli*; продолжительность жизни погибших иммунизированных мышей была намного больше, чем у контрольных (неиммунизированных). Сывороточные IgG и мукозальные sIgA анти-Stx2 антитела сохранялись у иммунизированных мышей на протяжении 2 мес. Авторы работы полагают, что рекомбинантный штамм *M. bovis* BCG, экспрессирующий белок субъединицы В шига-токсина Stx2, может рассматриваться как потенциальная вакцина против STEC-инфекции.

Представленные выше результаты свидетельствуют, что аттенуированные ЕНЕС-штаммы *E. coli* O157:H7 и векторные вакцины на основе аттенуированных штаммов *Salmonella* и *M. bovis* (BCG) позволяют, в зависимости от способа их применения, индуцировать у животных как системный, так и местный интестинальный иммунные ответы, способные предотвратить адгезию патогена и последующую колонизацию им кишечника и обеспечить защиту макроорганизма от шига-токсинов.

#### **Вакцины на основе клеточных оболочек (теней)**

Одним из сравнительно новых научных направлений разработки вакцин для профилактики STEC-инфекции является использование оболочек (теней) бактериальных клеток (bacterial ghosts – BG), сохранивших целлюлярную морфологию и все нативные структуры, характерные для живой клетки патогена. В BG в неповрежденной форме присутствуют даже такие чувствительные и хрупкие структуры, как пили и фимбрии. Важно заметить, что в BG в неденатурированном виде сохраняются все иммунодоминантные антигены, способные индуцировать в макроорганизме системный и мукозальный иммунные ответы. ЛПС, связанные с внешней мембраной клеточной оболочки, обладают минимальной токсичностью по сравнению с химически очищенными препаратами ЛПС и поэтому не являются лимитирую-

щими для использования бактериальных теней в качестве вакцин [45].

Препараты BG получают путем передачи в целевые клетки грамотрицательных патогенов плазмидных ДНК с генами E бактериофага PhiX174 и с генами термостабильной нуклеазы *Staphylococcus aureus* (SNUC), активность которых в клетках-реципиентах индуцируются либо температурой, либо химическими препаратами. Ген E кодирует мембранный протеин из 91 аминокислоты, который способен внедряться во внешнюю и внутреннюю мембраны бактериальной клетки и формировать в клеточной стенке специфические туннели (поры), через которые происходит выход содержимого клетки. В свою очередь, SNUC в комбинации с белком E полностью разрушает одно- и двухцепочные нуклеотидные последовательности бактерий и вирусов. Таким образом, BG грамотрицательных патогенов не могут являться источником генов вирулентности и антибиотикорезистентности для других видов кишечных бактерий при пероральном введении их в макроорганизм. Следует также отметить, что BG, рассматриваемые в качестве возможных вакцин, не требуют для повышения иммуногенного ответа дополнительного введения адъювантов, поскольку сами обладают мощными адъювантными свойствами [45]. Следующим важным свойством BG, которое привлекает внимание исследователей, является их способность быть носителями (векторами) гетерологичных протективных антигенов, которые экспрессируются на поверхности клеточной стенки еще живой бактерии при передаче ей соответствующих генетических детерминант. Сегодня клеточные оболочки (тени), в том числе несущие гетерологичные антигены, получены для многих важных для человека и животных патогенов: *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, энтеропатогенных и энтерогеморрагических *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* и др. [46].

Первые исследования, посвященные разработке вакцины против ЕНЕС на основе BG, были опубликованы в 2005 г. Maур et al. [46]. Работа была выполнена на штамме *E. coli* O157:H7, продуцирующим шига-токсины Stx1 и Stx2. Для получения BG авторы использовали литический протеин E бактериофага PhiX174, а для деградации ДНК штамма – нуклеазу SNUC. Индукцию экспрессии гена E в культуре клеток *E. coli* O157:H7, выращенных в ферментере, осуществляли повышением температуры от 28 до 42°C, экспрессию гена нуклеазы SNUC – добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиринозида (IPTG). Полученные клеточные оболочки штамма *E. coli* O157:H7 не содержали каких-либо детерминант патогенности и антибиотикорезистентности. Для оценки протективных и иммуногенных свойств BG опытных мышей иммунизировали одно-двукратно интрагастрально в дозе 1 мг/мышь лиофильно высушенных BG, что соответствовало 4,8 × 10<sup>9</sup> единиц BG. На 55-й день после иммунизации мыши были заражены гетерологичным штаммом *E. coli* O157:H7 в дозе 1 × 10<sup>8</sup> КОЕ. Как показали результаты эксперимента, мыши, иммунизированные BG однократно, после интрагастрального заражения выжили в 86% случаев, при двукратной иммунизации – в 93,9% случаях, в то время как в контрольных (неиммунизированных) группах живыми оста-

лись 26,7 и 30% животных соответственно. Через 7 дней после заражения в фекалиях выживших иммунизированных животных *E. coli* O157:H7 не обнаруживали. BG *E. coli* O157:H7 индуцировали у животных образование специфических сывороточных IgG, в то время как sIgG определяли и в сыворотке крови, и в содержимом кишечника. У иммунизированных мышей был также отмечен повышенный уровень секреции клетками селезенки γ-интерферона. Таким образом, интрагастральная иммунизация мышей препаратом BG *E. coli* O157:H7 индуцировала у животных системный и местный мукозальный иммунные ответы, которые обеспечивали защиту животных от перорального заражения их клетками штамма *E. coli* O157:H7.

В другой работе Maур et al. [47] были испытаны иммуногенные и протективные свойства BG вирулентного штамма *E. coli* O157:H7 при ректальном способе введения антигена. Как показали результаты эксперимента, однократная доза вакцины (1 мг) без применения адъюванта индуцировала у животных специфический системный и мукозальный иммунные ответы: высокие титры IgG (1:2000 и выше) были обнаружены в сыворотке крови, но не в кишечном содержимом; в то же время мукозальные sIgA обнаруживали в сыворотке крови и содержимом кишечника в титрах 1:80 и 1:60 соответственно. Было показано также, что ректальная вакцинация даже одной дозой BG индуцировала у животных 100%-ю защиту от перорального заражения двумя летальными дозами LD<sub>50</sub> гетерологичного штамма *E. coli* O157:H7. В заключение авторы высказывают предположение, что ректальный способ введения вакцины на основе BG может быть эффективным и безопасным и при иммунизации детей против ЕНЕС-инфекции; не исключено, что эффективной может оказаться даже однократная ректальная вакцинация.

Иммуногенные и протективные свойства BG *E. coli* O157:H7 были изучены и в экспериментах на телятах [48]. Животных иммунизировали препаратом BG подкожно в дозе 10 мг дважды с промежутком между инъекциями в 21 день. Спустя 2 нед. после вакцинации в сыворотке крови животных обнаруживали высокие титры специфических анти-BG IgG-антител; однако IgG-антитела отсутствовали в слюне и фекалиях. Мукозальные специфические sIgA в низких титрах детектировали в слюне иммунизированных телят, в сыворотке крови и в фекалиях их не выявляли. Несмотря на то, что в кишечном содержимом и в сыворотке крови sIgA не были обнаружены, иммунизированные животные, после их перорального заражения, по сравнению с контрольными (неиммунизированными) были лучше защищены от колонизации штаммом *E. coli* O157:H7: продолжительность выделения патогена у иммунизированных телят была существенно короче, чем у контрольных животных (11 дней против 15 дней); концентрация клеток *E. coli* O157:H7 в содержимом фекалий иммунизированных телят была ниже более чем на 50% по сравнению с контрольными животными. Описанный феномен частичной защиты телят от колонизации штаммом *E. coli* O157:H7 авторы объясняют низким содержанием специфических мукозальных sIgA, которые не удалось детектировать в данном эксперименте. Авторы, на основании полученных данных, предложили гипотезу, по которой наличие в слюне анти-BG-антител может свидетельствовать о

присутствии их на слизистой кишечника, что и обеспечивает защиту животных от ЕНЕС.

Cai et al. [20] испытали иммуногенные и протективные свойства кандидатной рекомбинантной вакцины rSOBGs, полученной на основе BG клеток *E. coli* O157:H7 EDL933, во внешнюю мембрану которых были встроены протеины нетоксичной субъединицы A2 и субъединицы B1 шига-токсинов Stx2 и Stx1 соответственно. Препаратами rSOBGs дважды интрагастрально иммунизировали мышей BALB/c в дозе 0,1 мг/мышь, что соответствовало  $1 \times 10^8$  КОЕ живого микроба. Иммунизированных мышей заражали интрагастрально или интраперитонеально различными дозами клеток гомологичного и гетерологичного штаммов *E. coli* O157:H7. Показано, что рекомбинантная вакцина rSOBGs индуцировала у иммунизированных животных образование в сыворотке крови IgG/sIgA Stx-специфических антител, а также строго специфических IgG/sIgA-антител к интимину, основному адгезину ЕНЕС. Группы иммунизированных rSOBGs вакциной животных после их перорального заражения живыми клетками *E. coli* O157:H7 или лизатами *E. coli* O157:H7 были лучше защищены, чем группа животных, иммунизированная препаратом OBGs без протеина StxA-StxB: от дозы 500 LD<sub>50</sub> живых клеток *E. coli* O157:H7 в первом случае выжило 52% животных от числа зараженных, во втором – только 12%. При заражении иммунизированных вакциной rSOBGs животных двумя дозами LD<sub>50</sub> живых клеток и 5 дозами LD<sub>50</sub> лизированных клеток *E. coli* O157:H7 выживаемость составила 73,3%, что гораздо больше процента выживших мышей, иммунизированных OBGs. В опытах *in vitro* сыворотка мышей, иммунизированных rSOBGs, обладала нейтрализующей активностью против шига-токсинов *E. coli* O157:H7. Кроме того, результаты гистологических исследований показали, что иммунизация животных rSOBGs снижает или ингибирует повреждающее действие адгезии патогена (A/E-эффекта) и его шига-токсинов на организм животных. Следовательно, кандидатная рекомбинантная вакцина rSOBGs индуцировала у животных как антиоксидантную, так и антиадгезивную защиту от ЕНЕС-инфекции. Авторы считают, что сконструированная ими кандидатная вакцина rSOBGs может быть эффективной и для защиты детей от ЕНЕС.

Таким образом, клеточные оболочки (тени) вирулентных штаммов ЕНЕС, а также оболочки клеток с дополнительно интегрированными в них рекомбинантными протективными антигенами сегодня могут рассматриваться в качестве перспективной иммунодоминантной конструкции при создании вакцин против STEC/ЕНЕС для перорального и ректального их применения.

### Липополисахаридные вакцины

Липополисахариды грамотрицательных бактерий являются гетерогенными молекулами, состоящими из трех доменов: липида А, определяющего эндотоксичность молекулы ЛПС, О-специфического ПС, определяющего бактериальную сероспецифичность, и связующего их олигосахаридную кору. ЛПС *E. coli* O157:H7, наряду с шига-токсинами, являются важным фактором патогенности возбудителя, участвуя в индукции и патогенезе ГК и ГУС [49, 50]. В многочисленных исследованиях на животных было установлено,

что только при совместном введении ЛПС и Stx2 наблюдаются клинические симптомы ГУС [51, 52]. Для ЛПС доказана также роль в адгезии патогенов: в опытах на различных видах животных было показано, что дефектные по ЛПС штаммы *E. coli* O157:H7 имели сниженную адгезивную и колонизационную активности [53], а антитела против ЛПС на 95% предотвращали адгезию гомологичных штаммов *E. coli* серогрупп O111 и O157 к клеткам эпителия кишечника человека *in vitro* [54].

Важное значение ЛПС в патогенезе ГК и ГУС – веское основание для изучения этих макромолекул в качестве целевых протективных антигенов при разработке липополисахаридных или субъединичных вакцин против ГК и ГУС. Следует отметить, что у больных и переболевших ГК и ГУС людей, включая детей, в сыворотке крови обнаруживают высокие титры специфических антител против ЛПС STEC-возбудителей [55, 56], что свидетельствует о высокой антигенной активности этого клеточного компонента.

В 1994 г. Konadu et al. [57], основываясь на положительном опыте по созданию липополисахаридных вакцин против *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, провели эксперименты по иммунизации мышей BALB/c конъюгатами полисахарида (О-антигена) *E. coli* O157:H7 с белками-носителями: бычьим сывороточным альбумином, инактивированным экзотоксином *Clostridium welchii* и рекомбинантным экзопротеином *Pseudomonas aeruginosa*. Было показано, что подкожная иммунизация мышей конъюгатами ПС индуцировала у них образование специфических IgG с бактерицидной активностью против *E. coli* O157:H7. Полученные результаты позволили авторам заключить, что сывороточные IgG против ЛПС способны трансудироваться из крови в кишечник и инактивировать в нем инокулом *E. coli* O157:H7, тем самым предотвращая развитие инфекции.

Высказанное положение нашло дальнейшее развитие в работе Robins et al. [58] и представлено в виде гипотезы, по которой антиполисахаридные IgG являются главным иммуноглобулиновым компонентом секреторных жидкостей организма, включая его кишечник. Эти IgG, по мнению авторов, и обеспечивают инактивацию инокулюма патогена на эпителиальной поверхности кишечника. О трансудации специфических IgG из плазмы крови и последующей адсорбции их на слизистой кишечника было сообщено в 2003 г. в работе Meckelein et al. [59]. Важная защитная роль антител против STEC продемонстрирована Paton et al. [54], которые показали, что поликлональные антитела против ЛПС O111 и O157 на 95% блокировали адгезию гомологичных штаммов *E. coli* O111:H- и O157:H- к эпителиальным клеткам кишечника человека.

В 1998 г. Konadu et al. [60] и в 2006 г. Ahmed et al. [61] провели успешные испытания вакцины, приготовленной на основе конъюгата полисахарида O157 и рекомбинантного экзопротеина *P. aeruginosa*, на взрослых волонтерах и 2–5-летних детях. И в том, и в другом случаях вакцина была безопасной и индуцировала у привитых уже в первые недели после вакцинации высокие титры специфических сывороточных IgG, обладающих бактерицидной активностью против *E. coli* O157:H7; специфические IgG-антитела у вакцинированных сохранялись на протяжении нескольких месяцев.

К сожалению, дальнейшая информация о судьбе разработанных этими коллективами вакцин отсутствует.

В работах аргентинских исследователей [62] также представлены данные, свидетельствующие о целесообразности использования специфических O111-полисахаридов (O-антигена) в качестве целевого антигена для конструирования вакцины против разных патотипов *E. coli* серогруппы O111 – энтеропатогенных (EPEC), энтерогеморрагических (EHEC) и энтероагрегативных (EAEC), различающихся по антигенной структуре и набору факторов патогенности.

Обращают на себя внимание результаты исследований Ademokoya et al. [63], которые показали, что интрагастральная и парентеральная иммунизация белых крыс препаратами ЛПС *E. coli* O157:H7 в одинаковой степени эффективно снижали концентрацию патогена в печени, селезенке, подвздошной кишке и фекалиях иммунных животных и в 70% случаев защищала их от перорального заражения смертельной дозой *E. coli* O157:H7 при 100%-й гибели контрольных (невакцинированных) животных.

В то же время Conlan et al. [64, 65] в своих исследованиях не получили доказательств, что образовавшиеся после подкожной иммунизации мышей BALB/c конъюгатом полисахарида ЛПС *E. coli* O157:H7 специфические анти-O157-антитела могут трансудироваться из кровяного русла на слизистую кишечника: ни разу IgG против O157 не были обнаружены в фекалиях иммунизированных животных. Не детектировались IgG против антигена O157 и в фекалиях мышей, которым внутривентриально вводили моноклональные IgG в дозе 1 мг/мышь. Внутривентриальная иммунизация не защищала мышей от колонизации *E. coli* O157:H7 после их интрагастрального заражения. Авторы работы считают, что парентеральная иммунизация не является подходящей для борьбы с кишечной инфекцией *E. coli* O157:H7, однако не исключают, что после оптимизации такой способ иммунизации может оказаться вполне эффективным.

### ДНК-вакцины

Конструирование ДНК-вакцин – одно из современных научных направлений, используемых для создания средств специфической защиты человека от инфекционных заболеваний. ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ перед другими вакцинными препаратами. Они, как полагают, наиболее безопасны для человека, поскольку в их составе отсутствуют бактериальные клетки или какие-либо их компоненты, способные отрицательно повлиять на макроорганизм. ДНК-вакцины содержат только известную ДНК и относительно просты в производстве. Плазмидные ДНК, используемые в вакцине, очень стабильны и устойчивы к экстремальным температурам и другим внешним факторам, что важно для хранения и транспортировки вакцинных препаратов. Особенностью ДНК-вакцин является их способность индуцировать иммунный ответ на ранней стадии жизни человека или животных, активируя созревание иммунной системы макроорганизма. Важно отметить также, что иммунный ответ на «генетическую вакцину» может быть повышен путем одновременного их введения с плазмидными ДНК, экспрессирующими различные цитокины, другие факторы, стимулирующие иммунный ответ, например гранулоцитмакрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста и др. [66–68].

ДНК-вакцины обычно представлены бактериальными плазмидами, несущими в своем составе эукариотические гены, обеспечивающие экспрессию протективных антигенов целевого патогена в эукариотической клетке.

В первой работе, посвященной получению ДНК-вакцины против ГУС, вызываемого STEC-штаммами, Carozzo A. et al. [69] сконструировали две эукариотические плазмиды, в одной из которых присутствовали гены В-субъединицы шига-токсина Stx2 (Stx2B), в другой – гены Stx2B вместе с deletированным геном Stx2A, детерминирующим синтез нетоксичного протеина А-субъединицы. Полученной ДНК-вакциной иммунизировали внутримышечно новорожденных и взрослых мышей BALB/c; отдельным группам животных одновременно с ДНК-вакциной вводили и плазмидную ДНК с генами фактора роста (pGM-CSF), способным повышать у животных гуморальный ответ. Результаты эксперимента показали, что обе «генетические вакцины», введенные мышам, индуцировали у взрослых и новорожденных животных анти-токсический иммунитет: мыши были защищены от заражения их нативным шига-токсином Stx2. Нейтрализующая активность сыворотки крови иммунизированных животных была продемонстрирована также в опыте *in vitro* на культуре клеток Vero.

Аналогичная описанной выше работа была выполнена Bentancor H. et al. [70], которые клонировали полный ген субъединицы В и deletированный ген субъединицы А2 шига-токсина Stx2 в составе эукариотической плазмиды pGM-CSF, кодирующей мышинный гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор. Полученная ДНК-вакцина индуцировала в организме мышей образование специфических сывороточных анти-Stx2-антител IgG. В опытах *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована анти-токсическая активность вакцины: иммунизированные животные были защищены от заражения их шига-токсином Stx2, а сыворотка крови иммунных мышей обладала нейтрализующей шига-токсин Stx2 активностью и защищала клетки Vero от гибели.

Иранские исследователи [68] встроили в эукариотическую плазмиду три гена, кодирующие синтез протективных антигенов EHEC: секреторного протеина EspA, интимина Eae и Tir-белка. При иммунизации мышей полученной ДНК-вакциной в сыворотке крови животных обнаруживали специфические антитела ко всем трем антигенам; мыши, иммунизированные этой вакциной, были защищены от перорального заражения их смертельными дозами штамма *E. coli* O157:H7, то есть ДНК-вакцина в данном случае обеспечивала животным ярко выраженную антиколониционную защиту.

В последнее время благодаря биоинформационному анализу в геномах штаммов *E. coli* O157:H7 были выявлены новые иммунодоминантные протективные антигены, которые исследователи с успехом использовали при конструировании ДНК-вакцины против EHEC-штаммов [18]. Так, например, идентифицированный с помощью информационного анализа ген *eseC*, кодирующий секреторный протеин T3SS-системы, будучи встроен в эукариотическую плазмиду, при интраназальной иммунизации мышей BALB/c индуцировал у животных образование специфических сывороточных IgG и мукозальных sIgA в кишечном тракте. У иммунизированных ДНК-вакциной мышей после их перорального заражения

штаммом *E. coli* O157:H7 отмечали существенное снижение количества клеток патогена в фекалиях, содержимом толстого кишечника и слепой кишки по сравнению с контрольными (невакцинированными) животными [18, 71]. При конструировании ДНК-вакцин были использованы и другие новые идентифицированные антигены ЕНЕС, показавшие при иммунизации животных хороший иммуногенный и протективный эффекты.

Таким образом, ДНК-вакцины, содержащие в своем составе рекомбинантные гены шига-токсинов и антигенов адгезии ЕНЕС-штаммов, при внутримышечной и интраназальной аппликации их лабораторным животным способны индуцировать у них системный антиоксидантный и мукозальный интестинальный антиколонизационный иммунные ответы и защитить животных от ЕНЕС-инфекции.

### Нановакцины

Создание вакцин против шига-токсин-продуцирующих *E. coli* на основе наночастиц, носителей протективных антигенов – одно из новейших и многообещающих научных направлений в данной области исследований. Для конструирования кандидатных нановакцин чаще всего используют два вида носителей: наночастицы природного полимера полисахарида хитозана и наночастицы неорганического золота.

Наночастицы хитозана (величиной 100–500 нм) отличаются высокой биосовместимостью с органами и клетками макроорганизма; они прочно связывают и удерживают на своей поверхности антигены белковой природы и защищают их от протеазной активности ферментов. Наночастицы хитозана хорошо прилипают к эпителиальным клеткам слизистых носоглотки и кишечного тракта и свободно проникают в ткани и клетки организма. Они нетоксичны, будучи введенные в организм, постепенно подвергаются биодеградации и элиминации [17, 72, 73]. Наночастицы хитозана обладают еще одним интересным свойством: для них характерна определенная антибактериальная активность, в том числе против *E. coli*. При конструировании вакцин наночастицы хитозана выполняют не только функцию носителя целевых антигенов, но и одновременно являются хорошими адъювантами: они существенно увеличивают гуморальный и клеточный иммунные ответы на вводимые в макроорганизм антигены. Аппликация нановакцин на основе хитозана может осуществляться различными способами: интраназально, перорально и парентерально (подкожно и внутримышечно). Важно отметить, что при пероральной доставке нановакцины способны индуцировать у животных образование мукозальных антител sIgA, обеспечивающих основную защиту кишечного тракта от колонизации его патогенами. Установлено также, что наночастицы хитозана способны пролонгировать иммуногенное действие мобилизованных на них антигенов. Еще одно преимущество «хитозановых нановакцин» – это сравнительно дешевый и простой способ их получения [73].

Наночастицы золота так же, как и наночастицы хитозана, прочно удерживают различные биологические макромолекулы на своей поверхности, в том числе иммунодоминантные антигены бактерий (рис. 4). Наночастицы золота нетоксичны, однако, в отличие от наночастиц хитозана, не обладают адъювантными свойствами. Их использование в качестве носителей протективных антигенов, как это будет по-

казано ниже, позволяет получать достаточно напряженный иммунный ответ и на антигены STEC.

В 2016 г. Doavi et al. [74] сообщили об успешном испытании вакцины против ЕНЕС штамма *E. coli* O157:H7, сконструированной на основе наночастиц хитозана с иммобилизованными на них молекулами антигена – трехвалентного рекомбинантного слитного белка из Eae-, Tir- и EspA-протеинов. Мышей линии BALB/c иммунизировали приготовленной нановакциной трехкратно интраназально, используя для этого электроспрей. Однократная доза антигена на мышью составляла 20 мкг, на весь цикл иммунизации – 60 мкг. Отдельную группу мышей иммунизировали интраперитонеально. Специфические титры IgG и sIgA определяли с помощью ИФА в сыворотке крови, фекалиях и смывах глаз опытных животных. Было показано, что трехкратная интраназальная иммунизация мышей индуцировала у них образование высоких титров специфических IgG и sIgA против всех трех антигенов, которые обнаруживали как в сыворотке крови, так и в содержимом кишечника; в незначительных количествах sIgA-антитела обнаруживали также в смывах глаз. При интраперитонеальном введении нановакцины секреторные sIgA в фекалиях не определялись.

У иммунизированных интраназально нановакциной мышей после их заражения клетками *E. coli* O157:H7 концентрация патогена на протяжении всего эксперимента в фекалиях животных была низкой, а на 8–9-й день после заражения возбудитель из фекалий уже не выделялся. Напротив, у контрольных (неиммунизированных) животных культуру *E. coli* O157:H7 из фекалий высевали в высокой концентрации (~1 × 10<sup>8</sup> КОЕ/г) на протяжении всех трех недель наблюдения. Авторы работы делают вывод, что интраназальный способ введения нановакцины на основе хитозана является весьма эффективным и может рассматриваться в качестве альтернативного другим методам аппликации нановакцин против ЕНЕС-инфекции.

Khanifer et al. [17] испытали эффективность нановакцины, сконструированной в выше рассмотренной работе Doavi et al. [74], при оральной, орально-интраперитонеальной и подкожной ее доставке мышам BALB/c. Животных иммунизировали четырехкратно, доза антигена при оральном однократном введении составляла 10 мкг/мышью, на весь цикл иммунизации – 40 мкг. При интраперитонеальной и подкожной иммунизации доза антигена на весь цикл составляла 10 мкг. Как показали результаты проведенного эксперимента, только оральная и орально-интраперитоне-

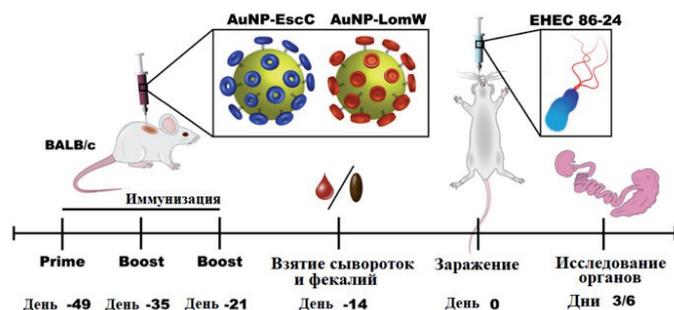


Рис. 4. Схема вакцинации мышей линии BALB/c и заражения штаммом ЕНЕС O157:H7, с последующим забором крови, фекалий и органов [76].

альная (трехкратное оральное + однократное интраперитонеальное введение антигена) вакцинация индуцировала у животных системный и мукозальный иммунные ответы. Высокие титры специфических IgG-антител против интимина, Tir- и EspA-протеинов были обнаружены только в сыворотке крови мышей. Напротив, мукозальные sIgA-антитела определялись как в сыворотке крови, так и в фекалиях иммунизированных животных. При интраперитонеальном и подкожном введении нановакцины у животных выявляли только сывороточные IgG, мукозальные sIgA в сыворотке крови иммунизированных животных отсутствовали. В опыте на культуре клеток Caco-2 было показано, что обработанные иммунной сывороткой клетки *E. coli* O157:H7 резко теряли свои адгезивные свойства, а животные, иммунизированные нановакциной орально или орально-интраперитонеально, были маловосприимчивы к пероральному заражению живой культурой *E. coli* O157:H7: концентрация патогена в кишечном содержимом у них была существенно ниже, чем у контрольных (неиммунизированных) животных, что свидетельствует о формировании у вакцинированных животных местного антиколонизационного мукозального иммунитета. На основании полученных данных Khanifer et al. делают заключение, что вакцина на основе наночастиц хитозана с иммобилизованным на них слитным белком (интимин + белки Tir и EspA) способна защитить животных от EHEC-штамма *E. coli* O157:H7. После всесторонней оценки преимуществ и рисков такой нановакцины она, по мнению авторов, может быть допущена до клинических испытаний.

Тот же коллектив иранских исследователей (Khanifer et al.) в 2019 г. [75] приготовил нановакцину на основе частиц хитозана, одна часть которых была нагружена слитным трипептидом (интимин + белки Tir и EspA), другая – рекомбинантным белком В-субъединицы шига-токсина Stx2. Мышей иммунизировали, как и в выше описанной статье, орально, орально-интраперитонеально и подкожно. Оральная однократная иммунизирующая доза антигена включала 100 мкг/мышь рекомбинантного трипептида и 100 мкг рекомбинантного пептида Stx2B. При интраперитонеальном и подкожном введении доза антигена составляла 15 + 15 мкг/мышь. Как показали исследования, оральная и орально-интраперитонеальная иммунизация мышей нановакциной индуцировала у животных образование высоких титров специфических sIgA-антител против слитного трипептида и протеина Stx2B, которые обнаруживали как в сыворотке крови, так и в содержимом кишечника животных. В значительно меньших титрах sIgA-антитела были выявлены в сыворотке крови и фекалиях у мышей, иммунизированных нановакциной подкожно. И наоборот, IgG в больших титрах присутствовали в сыворотке крови мышей, иммунизированных нановакциной подкожно, и в значительно меньшем – при иммунизации оральным путем. В опытах на клетках Vero было продемонстрировано, что сыворотка иммунизированных животных обладала нейтрализующей активностью в отношении токсина Stx2. Зараженные смертельной дозой шига-токсина Stx2 иммунизированные нановакциной мыши в 66% случаев остались живыми, в то время как все контрольные животные погибли. Нановакцина также существенно снижала и выделение *E. coli* O157:H7 с фекалиями у орально иммунизированных мышей после их перораль-

ного заражения. Таким образом, в работе было продемонстрировано, что нановакцина, полученная на основе частиц хитозана и иммунодоминантных антигенов EHEC, способна при пероральной иммунизации защитить животных как от шига-токсинов *E. coli*, так и от колонизации их кишечного тракта патогеном *E. coli* O157:H7.

Sanchez-Villamil et al. [76] разработали вакцину против *E. coli* O157:H7 на основе наночастиц золота, на которых были мобилизованы два пептида: EspC и LomW, обнаруженные у разных патотипов *E. coli* с помощью биоинформационного анализа их геномов. EspC – секреторный белок T3SS-системы, величиной 56 кДа, располагается на внешней мембране клетки и участвует в адгезии патогенов. Он присутствует не только в клетках EHEC, но и в клетках EPEC, вызывающих тяжелую диарею у детей. Антиген LomW (28 кДа) кодируется генами профага *E. coli* O157:H7, он локализован на внешней мембране клетки, как и антиген EspC. Помимо штаммов EHEC, этот антиген обнаружен у штаммов EAEC, также играющих важную роль в этиологии диарейных заболеваний. Антигены EspC и LomW хорошо инкорпорировались и ковалентно связывались с наночастицами золота (AuNPs), образуя стабильные и, как оказалось, иммуногенные структуры-нановакцины: AuNPEspC и AuNPLomW. Указанными вакцинами и их комбинацией вместе с адъювантами (гидроокись алюминия и детоксицированный холерный токсин) трехкратно иммунизировали мышей BALB/c подкожно. Суммарная доза антигенов на весь цикл иммунизации составила 10 мкг/мышь. Как показали результаты эксперимента, во всех трех группах животных, иммунизированных нановакцинами AuNP-EspC, AuNPLomW и AuNP-EspC+AuNP-LomW, на 3-и и 6-е сутки после интрагастрального заражения их штаммом *E. coli* O157:H7 в образцах содержимого толстого кишечника отмечали резкое снижение концентрации патогена по сравнению с контрольными (неиммунизированными) животными, что свидетельствовало о формировании у иммунизированных мышей мукозального антиколонизационного иммунитета. И действительно, у всех трех групп иммунизированных мышей обнаруживали высокие титры специфических анти-EspC- и анти-LomW-антител IgG и sIgA как в сыворотке крови, так и в содержимом кишечника животных. То есть, в данной работе получены уникальные данные: подкожная аппликация вакцины на основе наночастиц золота индуцирует у животных не только системный, но и мукозальный иммунные ответы, которые подавляют адгезивную и колонизационную активность патогена *E. coli* O157:H7. Более того, в экспериментах *in vitro* на культуре клеток кишечного эпителия человека (IECs, Caco-2) было продемонстрировано, что сыворотка крови мышей, иммунизированных нановакциной AuNP-EspC, в 98% случаев ингибировала не только адгезию EHEC *E. coli* O157:H7, но и клеток EPEC *E. coli* O127:H6, поскольку антиген EspC присутствует, как уже упоминалось выше, и у EHEC-, и у EPEC-штаммов. В то же время сыворотка крови животных, иммунизированных нановакциной AuNPLomW, ингибировала адгезию к клеткам IECs и Caco-2 и штамма EHEC *E. coli* O157:H7, и гибридного штамма EAEC/EHEC *E. coli* O104:H4. Сыворотка от животных, иммунизированных комбинацией AuNPEspC + AuNPLomW, ингибировала адгезию штаммов трех патотипов: EHEC, EPEC и EAEC/EHEC. Заклучая свою

работу, авторы предлагают использовать разработанную ими методологию получения нановакцины в качестве универсальной платформы для создания нановакцин для профилактики других кишечных инфекций.

В последние 10 лет для разработки вакцин против грам-отрицательных бактерий-патогенов активно используют везикулы их внешних мембран (OMV), образующихся при обработке клеток детергентами. Образовавшиеся везикулы – это наночастицы величиной 0,28–99 нм, содержащие в своем составе многие нативные антигены, включая различные токсины, обладающие иммуномодулирующими свойствами. Так, в работе Fingerman et al. [77] было продемонстрировано, что полученные из клеток вирулентного штамма *E. coli* O157:H7 обработкой диоксихелатом натрия и инактивированные глутаральдегидом везикулы внешней мембраны патогена обладали высокими протективными и иммуногенными свойствами. Мыши, вакцинированные OMV*i* подкожно дважды в дозе 10 мкг вместе с адьювантом гидроксида алюминия, в 100% случаев были защищены от смертельных доз шига-токсинов Stx1 и Stx2 и других токсических факторов *E. coli* O157:H7. Эти же препараты OMV*i* индуцировали у телят образование высоких титров сывороточных IgG. Дальнейшие исследования OMV*i* энтеробактерий позволят оценить, насколько перспективно использовать их для создания вакцинных препаратов против STEC-инфекции.

#### **Вакцины, создаваемые на основе методов обратной вакцинологии**

Анализ представленного выше материала показывает, что для разработки кандидатных вакцин против STEC-инфекции исследователи чаще всего используют весьма ограниченное число хорошо изученных протективных антигенов EHEC: белки EspA, EspB, Tir, интимин, а также нетоксичные дериваты шига-токсинов Stx1 и Stx2. Поэтому вполне логичными являются проводимые в настоящее время исследования по поиску новых иммунопротективных антигенов, способных индуцировать у человека и животных системный и мукозальный иммунные ответы и обеспечить эффективную защиту их от STEC-штаммов.

Одним из научных подходов, используемых в последнее время исследователями для поиска новых протективных антигенов для конструирования вакцины против STEC, являются методы обратной вакцинологии [17]. Суть этого подхода – идентификация протективных антигенов *in silico* путем сравнительного биоинформационного анализа геномов целевых патогенных бактерий между собой или между патогенными и непатогенными штаммами одного вида бактерий. Примером использования методов обратной вакцинологии при поиске новых антигенов EHEC является работа лаборатории Torres [17, 71]. Используя базы данных, авторы сравнили геномы двух EHEC-штаммов *E. coli* O157:H7 и двух непатогенных штаммов *E. coli* K12 и HS. В результате проведенного анализа геномов указанных четырех штаммов для последующего исследования было отобрано 65 генов *E. coli* O157:H7, отсутствующих у непатогенных эшерихий. Эти гены кодировали протеины, предположительно секретируемые клеткой во внешнюю среду или локализованные на ее внешней мембране. Все 65 гипотетических про-

теинов были подвергнуты иммуноинформационному анализу: у них были изучены физико-химические свойства, адгезивность, антигенность и наличие предполагаемых иммунодоминантных эпитопов. На основании полученных данных протеины были категорированы на три потенциально перспективные группы: протеины-кандидаты с высоким, средним и низким приоритетом. Далее из каждой названной группы было выбрано по три гена, которые были клонированы в плазмиде PAX1. ДНК полученных плазмид с генами предполагаемых протеинов использовали в качестве ДНК-вакцин, иммуногенные и протективные свойства которых были испытаны на мышах BALB/c. Животных вакцинировали плазмидными ДНК интраназально вместе с адьювантом – ДНК субъединицы В холерного токсина. Результаты эксперимента показали, что ДНК всех трех генов из группы высокого приоритета, кодирующих соответственно Lom-подобный протеин (pVAX3), гипотетический протеин субъединицы пилина (pVAX12) и фрагмент структурного протеина EscC системы T3SS (pVAXSb.2), индуцировали у животных продукцию специфических сывороточных IgG- и мукозальных sIgA-антител, а также повышенное количество Th2-зависимых цитокинов. За счет мукозальных sIgA у вакцинированных мышей после их перорального заражения клетками *E. coli* O157:H7 была существенно снижена концентрация патогена в кишечном содержимом по сравнению с контрольными (невакцинированными) животными. Наибольшая антиколониционная активность была отмечена у ДНК вакцины pVAXSb.2, детерминирующей синтез фрагмента структурного протеина EscC системы T3SS. Таким образом, с помощью биоинформационного анализа авторам удалось идентифицировать три новых протективных антигена у EHEC-штаммов *E. coli* O157:H7 – EscC, структурный белок системы T3SS, Lom-подобный протеин и протеин субъединицы пилина.

Принципы обратной вакцинологии в комбинации с протеомикой использованы и в работе Lo et al. [78]. Цель работы – поиск новых протективных антигенов *E. coli*, способных обеспечить перекрестную защиту человека и животных от инфекций, вызываемых разными патотипами *E. coli*. Используя биоинформационные методы, авторы провели сравнительный анализ 1700 геномов *E. coli* (62 полных и 1638 частично секвенированных). Исследованные штаммы были выделены в разные годы в различных географических зонах от людей и животных при различных патологиях: бактериемии, сепсисе, диарее, ГУС, маститах, менингитах, перитонитах, омфалитах, при инфекциях респираторного и уринарного трактов. Поиск генов, детерминирующих протективные антигены, осуществляли среди консервативных жизненно важных для бактериальной клетки генов, присутствующих более чем у 99% исследованных *E. coli*. В результате проведенного анализа были отобраны 4 гена, кодирующие протеины, предположительно локализованные на внешней мембране клетки. Все четыре гена были клонированы, а у детерминируемых ими протеинов были испытаны иммуногенные и протективные свойства. Оказалось, что среди четырех протеинов только протеин YneE индуцировал у вакцинированных мышей высокие уровни IgG и защиту животных от системной инфекции, вызванной UPEC-штаммом. Было установлено, что ген, детерминирующий протеин YneE, присутствует у

штаммов *E. coli* патотипов ETEC, EHEC, EAEC и UPEC. Этот белок был обнаружен в супернатантах культуральной жидкости *E. coli* всех четырех патотипов. Учитывая высокие иммуногенные и протективные свойства УпеЕ-протеина, его высокую консервативность, растворимость, а также факты экспрессии его в процессе инфекции у человека (по обнаружению специфических антител), авторы делают заключение, что протеин УпеЕ полностью отвечает требованиям кандидатных протективных антигенов и может использоваться при конструировании мультивалентных (против многих патотипов *E. coli*, включая EHEC) вакцин.

Краткий анализ представленных выше двух работ свидетельствует о больших перспективах методов обратной вакцинологии при разработке эффективных вакцин против различных бактериальных кишечных патогенов, включая шига-токсин продуцирующие штаммы *E. coli*.

### Заключение

В системе мер борьбы со STEC-инфекцией человека (ГК и ГУС) важная, если не решающая роль отводится разработке средств специфической профилактики – вакцинам, поскольку этиотропное лечение данной болезни противопоказано. Как следует из представленного в обзоре материала, в настоящее время исследователи разрабатывают различные вакцины: корпускулярные убитые, живые аттенуированные, вакцины на основе клеточных оболочек (тений), липополисахаридные вакцины, ДНК-вакцины и нановакцины. Субъединичные рекомбинантные вакцины будут рассмотрены во второй части обзора.

Все разрабатываемые кандидатные вакцины, по заключению их авторов, способны с той или иной степенью эффективности защитить лабораторных и сельскохозяйственных животных от STEC-штаммов. В такой ситуации исключительно важным представляется выбор типа вакцины, разрабатываемой для человека. Такой выбор, на наш взгляд, должен учитывать следующие факторы: для какой категории населения будет создаваться вакцина; какой вид адаптивного иммунитета предполагается получить у вакцинированного: системный, интестинальный мукозальный или колостральный; какой способ и число аппликаций вакцины будет применяться. Поскольку этиологическая структура ГК и ассоциированного с ним ГУС весьма сложная (инфекцию могут вызвать STEC-штаммы многих серогрупп), важно определиться, против каких возбудителей создается вакцина: или против небольшого числа доминирующих в том или ином регионе STEC, включая серотип *E. coli* O157:H7, или против любого STEC-штамма. Не последнюю роль в выборе типа вакцины играют сложность и стоимость биотехнологии ее производства. Наши приоритеты и наш взгляд на выбор типа вакцины против ГК и ГУС человека будут изложены во второй части обзора.

### Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках гранта Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31.10.2019 г.).

### Financial support

The study was carried out within the framework of a grant from the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2019-1671 of October 31, 2019).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература/References

1. Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(6):447-455. DOI: 10.1089/fpd.2013.1704
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Shiga-toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
3. Lisboa LF, Szelewicki J, Lin A, Latonas S, Li V, Zhi S, et al. Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in the Province of Alberta, Canada, 2009-2016. *Toxins (Basel)*. 2019;11(10):613. DOI: 10.3390/toxins11100613
4. Степаншин ЮГ, Светоч ЭА, Ерусланов БВ. Эпидемиологическая значимость и характеристика штаммов *Escherichia coli* O157:H7. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005;2:16-21./Stepanshin YuG, Svetoch EA, Yeruslanov BV, Bannov VA, Borzenkov VN, Gusev VV. The Epidemiological significance and characteristics of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology and Infectious Diseases (Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni)*. 2005;2:16-21. (In Russian).
5. Кафтырева ЛА, Макарова МА, Коновалова ТА, Матвеева ЗН. Характеристика энтерогеморрагической *Escherichia coli* O145:H28, выделенной от пациента с гемолитико-уремическим синдромом. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013;5:100-104./Kaftyreva LA, Makarova MA, Konovalova TA, Matveeva ZN. Characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 isolated from a patient with hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013;5:100-104. (In Russian).
6. Онищенко ГГ, Дятлов ИА, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Баннов ВА, Карцев НН, и др. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 г. Вестник Российской академии медицинских наук. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234/Onishchenko GG, Dyatlov IA, Svetoch EA, Volozhantsev NV, Bannov VA, Kartsev NN, et al. Molecular-genetic Characterization of Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* Isolated During a Food-Borne Outbreak in St. Petersburg in 2013. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk (Annals of the Russian academy of medical sciences)*. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234 (In Russian).
7. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(6-7):405-418. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.009
8. Marks HM, Tohamy SM, Tsui F. Modeling uncertainty of estimated illnesses attributed to non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its impact on illness cost. *J Food Prot*. 2013;76(6):945-952. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-409
9. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis*. 2005;192(8):1422-1429. DOI: 10.1086/466536
10. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*. 2011;193(12):883-891. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6
11. Soon JM, Seaman P, Baines RN. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(3):346-354. DOI: 10.1016/j.ijheh.2012.07.005

12. Степаншин ЮГ, Светоч ЭА, Ерусланов БВ, Баннов ВА, Борзенков ВН, Каврук ЛС. Бактерионосительство энтерогеморрагических эшерихий серовара O157:H7 у животных. Ветеринария. 2005;7:17-21./Stepanshin YuG, Svetoch EA, Eruslanov BV, Bannov VA, Borzenkov VN, Kavruk LS. Bakterionositel'stvo enterogemorragicheskikh esherikhii serovara O157:H7 u zhivotnykh. Veterinariya. 2005;7:17-21. (In Russian).
13. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW 4th. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol. 2014;86:145-197. DOI: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2
14. Gonzalez AGM, Cerqueira AMF. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. J Appl Microbiol. 2020;128(6):1568-1582. DOI: 10.1111/jam.14500
15. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(12):4868-4873. DOI: 10.1073/pnas.0710834105
16. Rojas-Lopez M, Monterio R, Pizza M, Desvaux M, Rosini R. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. Front Microbiol. 2018;9:440. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00440
17. Khanifar J, Hosseini RH, Kazemi R, Ramandi MF, Amani J, Salmanian AH. Prevention of EHEC infection by chitosan nano-structure coupled with synthetic recombinant antigen. J Microbiol Methods. 2019;157:100-107. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.01.002
18. Garcia-Angulo VA, Kalita A, Kalita M, Lozano L, Torres AG. Comparative genomics and immunoinformatics approach for the identification of vaccine candidates for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun. 2014;82(5):2016-2026. DOI: 10.1128/IAI.01437-13
19. Oliveira AF, Cardoso SA, Almeida FB, de Oliveira LL, Pitondo-Silva A, Soares SG, Hanna ES. Oral immunization with attenuated *Salmonella* vaccine expressing *Escherichia coli* O157:H7 intimin gamma triggers both systemic and mucosal humoral immunity in mice. Microbiol Immunol. 2012;56(8):513-522. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00477.x
20. Cai K, Tu W, Liu Y, Li T, Wang H. Novel fusion antigen displayed-bacterial ghosts vaccine candidate against infection of *Escherichia coli* O157:H7. Sci Rep. 2015;5:17479. DOI: 10.1038/srep17479
21. McNeilly TN, Mitchell MC, Rosser T, McAteer S, Low JC, Smith DG, et al. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. Vaccine. 2010;28(5):1422-1428. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.076
22. Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. FEMS Microbiol Lett. 2006;255(2):187-202. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00119.x
23. Torres AG, Kaper JB. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. Infect Immun. 2003;71(9):4985-4995. DOI: 10.1128/iai.71.9.4985-4995.2003
24. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from *espA*, *eae* and *tir* genes of *Escherichia coli* O157:H7. Vaccine. 2010;28(42):6923-6929. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.061
25. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(5):1664-1668. DOI: 10.1073/pnas.92.5.1664
26. Perna NT, Mayhew GF, Pósfai G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun. 1998;66(8):3810-3817. DOI: 10.1128/IAI.66.8.3810-3817.1998
27. Karpman D, Békássy ZD, Sjögren AC, Dubois MS, Karmali MA, Mascarenhas M, et al. Antibodies to intimin and *Escherichia coli* secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. Pediatr Nephrol. 2002;17(3):201-211. DOI: 10.1007/s00467-001-0792-z
28. Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infect Immun. 2000;68(9):5090-5095. DOI: 10.1128/iai.68.9.5090-5095.2000
29. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol Microbiol. 1998;30(5):911-921. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01144.x
30. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO J. 1998;17(8):2166-2176. DOI: 10.1093/emboj/17.8.2166
31. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell. 1997;91(4):511-520. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80437-7
32. Jerse AE, Kaper JB. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. Infect Immun. 1991;59(12):4302-4309. DOI: 10.1128/IAI.59.12.4302-4309.1991
33. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. Vet Immunol Immunopathol. 2013;152(1-2):2-12. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032
34. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW 4th. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol. 2014;86:145-197. DOI: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2
35. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. Clin Lab Med. 2015;35(2):247-272. DOI: 10.1016/j.cll.2015.02.004
36. Jeong YJ, Park SK, Yoon SJ, Park YJ, Lee MS. Experimental *In Vivo* Models of Bacterial Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. J Microbiol Biotechnol. 2018;28(9):1413-1425. DOI: 10.4014/jmb.1803.03012
37. Kerner K, Bridger PS, Köpf G, Fröhlich J, Barth S, Willems H, et al. Evaluation of biological safety *in vitro* and immunogenicity *in vivo* of recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids as candidate vaccines in cattle. Vet Res. 2015;46(1):38. DOI: 10.1186/s13567-015-0175-2
38. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Version 2. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(25):9667-9672. DOI: 10.1073/pnas.0602359103
39. Галиакбарова АА, Пирожков МК. Выявление связи между иммуногенной и антигенной активностью вакцины против колибактериоза животных. Вестник Российского Университета Дружбы Народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2020;15(2):200-209. DOI: 10.22363/2312-797X-2020-15-2-200-209 / Galiakbarova AA, Pirozhkov MK. Relationship between immunogenic and antigenic activity of the vaccine against colibacteriosis of animals. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. 2020;15(2):200-209. DOI: 10.22363/2312-797X-2020-15-2-200-209 (In Russian).
40. Sharma VK, Schaut RG, Loving CL. Vaccination with killed whole-cells of *Escherichia coli* O157:H7 *hha* mutant emulsified with an adjuvant induced vaccine strain-specific serum antibodies and reduced *E. coli* O157:H7 fecal shedding in cattle. Vet Microbiol. 2018;219:190-199. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.04.003
41. Schaut RG, Boggiatto PM, Loving CL, Sharma VK. Cellular and Mucosal Immune Responses Following Vaccination with Inactivated Mutant of *Escherichia coli* O157:H7. Sci Rep. 2019;9(1):6401. DOI: 10.1038/s41598-019-42861-z
42. Liu J, Sun Y, Feng S, Zhu L, Guo X, Qi C. Towards an attenuated enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 vaccine characterized by a deleted *ler* gene and containing apathogenic Shiga toxins. Vaccine. 2009;27(43):5929-5935. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.097
43. Gu J, Ning Y, Wang H, Xiao D, Tang B, Luo P, et al. Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. Vaccine. 2011;29(43):7395-7403. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.07.069
44. Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, et al. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* in mice. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(12):1932-1937. DOI: 10.1128/CVI.00473-12
45. Mayr UB, Walcher P, Azimpour C, Riedmann E, Haller C, Lubitz W. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(9):1381-1391. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.027
  46. Mayr UB, Haller C, Haidinger W, Atrasheuskaya A, Bukin E, Lubitz W, Ignatyev G. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. Infect Immun. 2005;73(8):4810-4817. DOI: 10.1128/IAI.73.8.4810-4817.2005
  47. Mayr UB, Kudela P, Atrasheuskaya A, Bukin E, Ignatyev G, Lubitz W. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. Microb Biotechnol. 2012;5(2):283-294. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x
  48. Vilte DA, Larzábal M, Mayr UB, Garbaccio S, Gammella M, Rabinovitz BC, et al. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves. Vet Immunol Immunopathol. 2012;146(2):169-176. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.03.002
  49. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005;365(9464):1073-1086. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2
  50. Arenas J. The role of bacterial lipopolysaccharides as immune modulator in vaccine and drug development. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2012;12(3):221-235. DOI: 10.2174/187153012802002884
  51. Ikeda M, Ito S, Honda M. Hemolytic uremic syndrome induced by lipopolysaccharide and Shiga-like toxin. Pediatr Nephrol. 2004;19(5):485-489. DOI: 10.1007/s00467-003-1395-7
  52. Keepers TR, Psotka MA, Gross LK, Obrig TG. A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. J Am Soc Nephrol. 2006;17(12):3404-3414. DOI: 10.1681/ASN.2006050419
  53. Sheng H, Lim JY, Watkins MK, Minnich SA, Hovde CJ. Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen deletion mutant and effect of the deletion on bacterial persistence in the mouse intestine and colonization at the bovine terminal rectal mucosa. Appl Environ Microbiol. 2008;74(16):5015-5022. DOI: 10.1128/AEM.00743-08
  54. Paton AW, Voss E, Manning PA, Paton JC. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. Microb Pathog. 1998;24(1):57-63. DOI: 10.1006/mpat.1997.0172
  55. Bitzan M, Moebius E, Ludwig K, Müller-Wiefel DE, Heesemann J, Karch H. High incidence of serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome. J Pediatr. 1991;119(3):380-385. DOI: 10.1016/s0022-3476(05)82049-9
  56. Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infect Immun. 2000;68(9):5090-5095. DOI: 10.1128/iai.68.9.5090-5095.2000
  57. Konadu E, Robbins JB, Shiloach J, Bryla DA, Szu SC. Preparation, characterization, and immunological properties in mice of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines. Infect Immun. 1994;62(11):5048-5054. DOI: 10.1128/IAI.62.11.5048-5054.1994
  58. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. J Infect Dis. 1995;171(6):1387-1398. DOI: 10.1093/infdis/171.6.1387
  59. Meckelein B, Externest D, Schmidt MA, Frey A. Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(5):831-834. DOI: 10.1128/cdli.10.5.831-834.2003
  60. Konadu EY, Parke JC Jr, Tran HT, Bryla DA, Robbins JB, Szu SC. Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157: phase 1 study of O157 O-specific polysaccharide-*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A conjugates in adults. J Infect Dis. 1998;177(2):383-387. DOI: 10.1086/514203. PMID: 9466525
  61. Ahmed A, Li J, Shiloach Y, Robbins JB, Szu SC. Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2–5-year-old children. J Infect Dis. 2006;193(4):515-521. DOI: 10.1086/499821
  62. Andrade GR, New RR, Sant'Anna OA, Williams NA, Alves RC, Pimenta DC, et al. A universal polysaccharide conjugated vaccine against O111 *E. coli*. Hum Vaccin Immunother. 2014;10(10):2864-2874. DOI: 10.4161/21645515.2014.972145
  63. Ademokoya AA, Adebolu TT, Ogundare AO. Evaluation of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7 for prophylactic ability against diarrhoea caused by homologous organism in Wistar albino rats. Glob Adv Res J Med Med Sci. 2015;4(3):117-120.
  64. Conlan JW, Cox AD, KuoLee R, Webb A, Perry MB. Parenteral immunization with a glycoconjugate vaccine containing the O157 antigen of *Escherichia coli* O157:H7 elicits a systemic humoral immune response in mice, but fails to prevent colonization by the pathogen. Can J Microbiol. 1999;45(4):279-286.
  65. Conlan JW, KuoLee R, Webb A, Cox AD, Perry MB. Oral immunization of mice with a glycoconjugate vaccine containing the O157 antigen of *Escherichia coli* O157:H7 admixed with cholera toxin fails to elicit protection against subsequent colonization by the pathogen. Can J Microbiol. 2000;46(3):283-290.
  66. Moreno S, Timón M. DNA vaccination: an immunological perspective. Inmunologia. 2004;23:41-55.
  67. Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:174378. DOI: 10.1155/2010/174378
  68. Shariati Mehr K, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Rajabi M. A DNA vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. Iran Biomed J. 2012;16(3):133-139. DOI: 10.6091/ibj.1059.2012
  69. Capozzo AV, Pistone Creydt V, Dran G, Fernández G, Gómez S, Bentancor LV, et al. Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. Infect Immun. 2003;71(7):3971-3978. DOI: 10.1128/iai.71.7.3971-3978.2003
  70. Bentancor LV, Bilen M, Brando RJ, Ramos MV, Ferreira LC, Ghiringhelli PD, Palermo MS. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. Clin Vaccine Immunol. 2009;16(5):712-718. DOI: 10.1128/CVI.00328-08. Erratum in: Clin Vaccine Immunol. 2010;17(8):1291.
  71. Kalita A, Kalita M, Torres AG. Exploiting the power of OMICS approaches to produce *E. coli* O157 vaccines. Gut Microbes. 2014;5(6):770-774. DOI: 10.4161/19490976.2014.983769
  72. Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian A-H, Arpanaei A, Amani J. Nanoparticles in Vaccine Development. J Appl Biotech Rep. 2014;1(4):125-134.
  73. Sahdev P, Ochyl LJ, Moon JJ. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. Pharm Res. 2014;31(10):2563-2582. DOI: 10.1007/s11095-014-1419-y
  74. Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Fasihi Ramandi M. Chitosan-Based Intranasal Vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. Iran Biomed J. 2016;20(2):97-108. DOI: 10.7508/ibj.2016.02.005
  75. Khanifar J, Salmanian AH, Haji Hosseini R, Amani J, Kazemi R. Chitosan nanostructure loaded with recombinant *E. coli* O157:H7 antigens as a vaccine candidate can effectively increase immunization capacity. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019;47(1):2593-2604. DOI: 10.1080/21691401.2019.1629947
  76. Sanchez-Villamil JI, Tapia D, Torres AG. Development of a Gold Nanoparticle Vaccine against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. mBio. 2019;10(4):e01869-19. DOI: 10.1128/mBio.01869-19
  77. Fingerhann M, Avila L, De Marco MB, Vázquez L, Di Biase DN, Müller AV, et al. OMV-based vaccine formulations against Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains are both protective in mice and immunogenic in calves. Hum Vaccin Immunother. 2018;14(9):2208-2213. DOI: 10.1080/21645515.2018.1490381
  78. Lo AW, Moriel DG, Phan MD, Schulz BL, Kidd TJ, Beatson SA, Schembri MA. 'Omic' Approaches to Study Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence. Trends Microbiol. 2017;25(9):729-740. DOI: 10.1016/j.tim.2017.04.006

**Информация об авторах:**

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: svetoch@obolensk.org

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: dyatlov@obolensk.org

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: kartsev@obolensk.org

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: erus47@yandex.ru

Канашенко Мария Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: kanashenko@obolensk.org

**Information about authors:**

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Science), professor, chief researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: svetoch@obolensk.org

Ivan A. Dyatlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: dyatlov@obolensk.org

Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, senior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: kartsev@obolensk.org

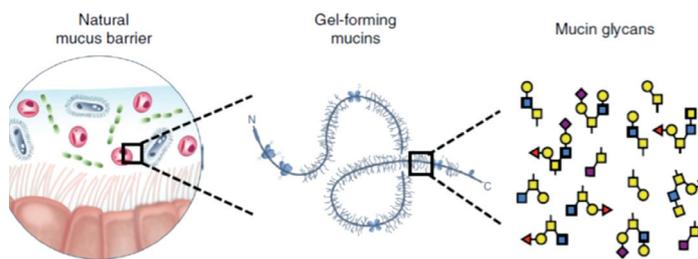
Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, leading researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: erus47@yandex.ru

Maria E. Kanashenko, junior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: kanashenko@obolensk.org

**НОВОСТИ НАУКИ**

**Искусственная слизь и микробиом**

Слизь – это трехмерный гидрогель, в котором находится большая часть человеческого микробиома. Слизистая среда играет важную роль в дифференциации и поведении микробных фенотипов и позволяет создавать пространственные распределения. Нарушение регуляции слизи в дальнейшем связано с различными заболеваниями. Поэтому слизь является ключевым ингредиентом для изучения поведения комменсальной и патогенной микробиоты *in vitro*. Микроорганизмы, культивируемые в слизи, имеют фенотипы, существенно отличающиеся от тех, которые представлены в стандартных лабораторных средах. В работе обсуждается влияние слизи на микробиом и исследуется структура и гликозилирование муцинов – основных строительных блоков слизи. Изучается влияние гликанов на функцию муцина и разрабатываются различные подходы к конструированию синтетических муцинов, включая синтез основной цепи, конструкции муциново-мицетических гидрогелей и конструирование гликанов. Наконец, обсуждаются миметики муцина для 3D-культуры клеток *in vitro* и для модуляции структуры и функции микробного сообщества.



Werlang C., Cárcamo-Oyarce G., Ribbeck K.  
 Engineering mucus to study and influence the microbiome.  
 Nat Rev Mater. 2019;4(2):134-45.

### ГКПМ-Оболенск



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

#### Коллекция оказывает услуги:

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

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

#### Подразделение, ответственное за осуществление деятельности

ГКПМ-Оболенск – отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ

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

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

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

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



Уважаемые коллеги!

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

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

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

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

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

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

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

#### Контактная информация:

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

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

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

Подробная информация

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



# Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

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

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

## Требования к оформлению статьи.

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

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

*Краткие сообщения* представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

### НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов\*, П. П. Петров\*\*

\*Первая организация, г. Москва, РФ

\*\*Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

**Статьи направлять по адресу:**

**142279, Московская обл.,**

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

**Тел. (4967) 36-00-46**

**Факс (4967) 36-00-10**

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

**или**

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