

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2020 • ТОМ 5 • №3

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

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

Подписано в печать 12.10.2020 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 1530 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

Применение масс-спектрометрии для выявления и идентификации патогенных микроорганизмов и биотоксинов. **5**

Экспериментальные статьи

Определение чувствительности к антимикробным препаратам
микроорганизмов рода *Klebsiella* методом MALDI-TOF MS
А.А.Самойлова, И.В.Лихачёв, Е.В.Зуева, Л.А.Краева, Е.В.Рогачёва, Н.В.Михайлов. **8**

Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба
от близкородственных бацилл
И.В.Бахтеева, В.В.Каптелова, Г.М.Титарева, Т.Б.Кравченко, Ю.О.Гончарова, К.В.Хлопова, В.С.Тимофеев **14**

Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов чумного микроба,
циркулирующих в песчаночьих природных очагах чумы Республики Казахстан
З.Ж.Абдел, Т.В.Мека-Меченко, А.А.Абдирасилова, Р.С.Мусагалиева, Ж.С.Далибаев, Э.Ж.Бегимбаева,
И.Б.Утепова, А.М.Матжанова, Д.Т.Есимсеит, Б.З.Абделиев, А.К.Рысбекова, А.К.Касенова, А.К.Умарова. **25**

Обзорные статьи

Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий, характеризующихся множественной устойчивостью
к антибактериальным препаратам
А.А.Филиппова, М.Ю.Рубцова, М.М.Уляшова, Н.К.Фурсова **34**

Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими
Escherichia coli. Часть 2
Э.А.Светоч, И.А.Дятлов, Н.Н.Карцев, Б.В.Ерусланов, М.Е.Канашенко, Н.К.Фурсова **47**

Страницы истории

Фитонциды: история и перспективы применения
С.А.Чубатова **60**

Правила оформления статей (основные положения) **68**

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

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

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

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

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviimyadagiin, PhD (Mongolia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)
V.A.Davidyants, Sc.D., prof. (Armenia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)
G.A.Karimova, PhD (France)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (England)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)
Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)

I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.L.Motin, prof. (USA)
T.V.Priputnevich, ScD (Russia)
A.Rakin (Germany)
K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.P.Shepelin, Sc.D. (Russia)
E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Editorial Office:

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Obolensk, Moscow region, 142279
Phone: +7-4967-360003, +7-4967-360046
Fax: +7-4967-360010
E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

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

Editor-in-Chief's Introduction

Application of mass spectrometry for the detection and identification of pathogenic microorganisms and biotoxins 5

Experimental Articles

Determination of sensitivity of microorganisms of the *Klebsiella* genus to antimicrobial drugs by the MALDI-TOF MS method
A.A.Samoilova, I.V.Likhachev, E.V.Zueva, L.A.Kraeva, E.V.Rogacheva, N.V.Mikhailov 8

Prototype of a multiplex PCR test system for differentiation of anthrax microbe from close-kinded bacilles
I.V.Bakhteeva, V.V.Kaptelova, G.M.Titareva, T.B.Kravchenko, Yu.O.Goncharova, K.V.Khlopova, V.S.Timofeev 14

Biological properties and molecular and genetic characteristics of plague microbe strains circulating in sandy natural plague foci of the Republic of Kazakhstan
Z.Zh.Abdel, T.V.Meka-Mechenko, A.A.Abdirasilova, R.S.Musagaliyeva, Zh.S.Dalibayev, E.Zh.Begimbayeva, I.B.Utepova, A.M.Matphanova, D.T.Yessimseit, B.Z.Abdeliyev, A.K.Rysbekova, A.K.Kasenova, S.K.Umarova 25

Review Articles

Expression of beta-lactamase genes in multidrug-resistant bacteria
A.A.Filippova, M.Yu.Rubtsova, M.M.Ulyashova, N.K.Fursova 34

Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 2
E.A.Svetoch, I.A.Dyatlov, N.N.Kartsev, B.V.Eruslanov, M.E.Kanashenko, N.K.Fursova 47

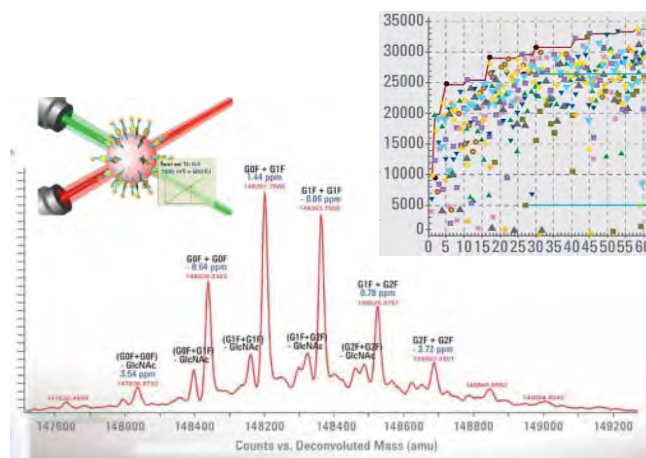
Pages of History

Phytoncides: history and application prospects
S.A.Chubatova 60

Instructions for Authors 68

Применение масс-спектрометрии для выявления и идентификации патогенных микроорганизмов и биотоксинов

Масс-спектрометрия выявляет микробиологические патогены на уровне рода в 97–99% случаев и на уровне вида – в 85–97%. Особо следует отметить поиск факторов патогенности в отсутствие микроорганизмов, их синтезировавших (токсины и микотоксины), а также прионов и рицина (или ему подобных). В случае белковых токсинов, которые действуют как ферменты (ботулинические всех типов, летальный фактор сибирской язвы, рицин и т.п.), могут быть использованы синтетические или клонированные и экспрессированные субстраты, по деструкции которых достаточно эффективно можно определять их наличие в образцах от больных или зараженных животных. Так, в большинстве случаев ботулизма разных типов (за исключением А) чувствительность MALDI TOF-анализа сопоставима с чувствительностью мышинной модели.



В случае небольших молекул, таких как микотоксины, либо прионов необходимо применять высокоаффинные молекулы, например антитела или аптамеры. Принципы определения взаимодействия антител (аптамеров) с микотоксинами или прионами могут быть самыми разнообразными – от иммуноферментного анализа и до иммуноаптамерной полимеразной цепной реакции (амплификационный анализ является самым высокочувствительным).

Важнейшая проблема определения спектра резистентности патогенных микроорганизмов к лекарственным средствам также может быть успешно решена с использованием время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с помощью анализа масс-спектров определенных микроорганизмов на наличие характерных паттернов резистентности, анализа индуцируемым бактериями гидролиза бета-лактамовых антибиотиков по изменению их массы после 30–180-минутной инкубации, определения аминокислотных остатков с меткой стабильными изотопами при росте бактерий в среде с антибиотиком, анализа бактериального роста в присутствии и отсутствии антибиотиков с использованием внутренних стандартов.

Золотым стандартным методом обнаружения активного ботулинического нейротоксина является постановка биопробы на животных. Для быстрого выявления и дифференциации ботулотоксинов был разработан аппаратный метод на основе использования масс-спектрометра Bruker MALDI-TOF MS Biotyper. Этот прибор широко применяется в российских лабораториях для идентификации выделенных культур. При прямом сравнении метода с биопробными мышами и использования масс-спектрометра Bruker MALDI для определения чувствительности анализа при выявлении ботулотоксинов А, В, Е, и F в эквивалентных концентрациях было показано, что для ботулотоксинов В, Е и F чувствительность масс-спектрометрического анализа была эквивалентной или лучше, чем при постановке биопро-

бы с разными значениями LD50. Ботулотоксин А был обнаружен в биопробе в более низких концентрациях, чем при масс-спектрометрии. При проведении сравнительных испытаний клинических образцов метод масс-спектрометрии быстро выявляет активность ботулотоксина и его серотипы в полном соответствии с результатами биопробы. Все это говорит о том, что анализ MS может генерировать надежные быстрые результаты, устраняя при этом необходимость тестирования на животных.

Еще одним патогенным биологическим агентом, имеющим значение в биологической безопасности, является рицин – высокотоксичный белок, который вызывает гибель клеток, блокируя синтез белка. Оперативное обнаружение малых концентраций токсина рицина в различных средах является актуальной и в то же время достаточно сложной задачей. Появились сообщения о выявлении активности рицина на основе *in vitro* MALDI TOF MS, который обнаруживает токсин посредством депурирования синтетического субстрата, специально разработанного для этих целей, оптимизации условий реакции и подготовкой образца. При этом рицин связывается со специфическими поликлональными антителами, полученными из гипериммунной сыворотки с последующим гидролизом комплекса антиген–антитело. Наличие рицина определяется в дальнейшем с помощью выявления уникального продукта расщепления синтетических олигомерных субстратов в масс-спектрометрическом анализе. Выявление депурированного субстрата было усилено с помощью более эффективного РНК-субстрата и оптимизации буферных компонентов, pH и температуры реакции, а также параметров самой масс-спектрометрии. Таким способом был достигнут предел обнаружения токсина, растворенного в молоке, равный 0,2 нг/мл, что превышает чувствительность традиционных методов более чем на два порядка. Эти разработки свидетельствуют о том, что масс-спектрометрия является одним из наиболее перспективных методов индикации опасных токсинов в биологических жидкостях.

Что касается практического использования, то MALDI-TOF MS является современным экспресс-методом детекции и в некоторых случаях дифференциации микроорганизмов дает возможность анализировать белковые экстракты микробной клетки, что существенно повышает возможности лабораторной диагностики и производительность труда в лабораториях. Чувствительность метода MALDI-TOF MS для разных бактериальных патогенов составляет от 10^3 до 10^6 микробных клеток в миллилитре, что позволяет проводить индикацию и идентификацию микроорганизмов. В настоящее время использование MALDI-TOF MS в лабораторной диагностике осуществляется путем сравнения полученных белковых профилей с базой данных референтных масс-спектров. Многие российские лаборатории оснащены типовыми приборами BioTyper (Bruker), которые широко используются для идентификации. База данных спектров в этих приборах достаточно широка, но охватывает из патогенных микроорганизмов только бактерии III–IV групп патогенности по национальной классификации и большое количество известных условно-патогенных и непатогенных бактерий. Это существенно затрудняет использование метода для решения оперативных вопросов в рамках санитарно-эпидемиологического надзора и биологической безопасности. Группой научных институтов Роспотребнадзора под эгидой РосНИПЧИ «Микроб» был создан банк масс-спектрометрических данных опасных бактерий I–II групп патогенности, позволяющий идентифицировать такие возбудители с использованием данного типа приборов. Это стало возможным благодаря тому, что данные приборы представляют собой системы открытого типа, базы данных которых могут быть дополнены новыми спектрами. Эта база данных внедрена в практическую работу научных институтов, осуществляющих функции центров индикации и диагностики в федеральных округах страны. В развитии этого направления в Ставропольском НИПЧИ проведен цикл работ по межвидовой дифференциации возбудителя бруцеллеза, для чего была создана электронная база референтных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза для идентификации и дифференциации изолятов *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*. Также впервые показана возможность выявления специфических маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных с острой формой заболевания методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры. Кроме того, на таком достаточно рутинном приборе (по сравнению с новейшими масс-спектрометрами высокого разрешения) удалось показать в некоторых случаях и штаммовые различия внутри одного вида бруцелл.

Все это говорит о высокой перспективности метода масс-спектрометрии для выявления и дифференциации патогенных бактерий.

Важность развития этого метода диагностики состоит в том, что он может эффективно использоваться в схемах выявления и дифференциации новых и вновь проявляющихся патогенов, когда для прогнозирующих программ важны множественные данные о свойствах выделенного возбудителя. В этой связи в разрабатываемый ГНЦ ПМБ (Оболенск) «Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов» будут включены в раздел свойств патогена, как признак дифференциации, данные о масс-спектрометрических свойствах. Это позволит существенно расширить возможности поисковой системы каталога при выявлении и определении территориальной приуроченности (происхождения) патогена, а также использовать эти данные в сочетании с другими для определения в образце совершенного нового возбудителя опасного заболевания.

Наибольшую озабоченность вызывает отсутствие собственных приборов для масс-спектрометрического анализа в России, хотя именно здесь 30–40 лет назад были разработаны основные подходы к использованию масс-спектрометрии для диагностики и даже созданы действующие лабораторные образцы. В последнее время наметились некоторые тенденции в создании таких отечественных приборов в рамках обеспечения технологической независимости, и наиболее рациональным представляется создание компактных масс-спектрометрических идентификаторов, использующих российские базы данных микроорганизмов и токсинов, которыми могут быть оснащены практические клинично-диагностические лаборатории.

Для крупных научных учреждений, осуществляющих референтные функции, являющихся центрами индикации и диагностики патогенных биологических агентов, осуществляющих фундаментальные исследования в области молекулярных взаимодействий «патоген–хозяин» и прикладные разработки новых диагностических, профилактических и терапевтических средств, необходимо оснащение высокочувствительными прецизионными масс-спектрометрами, позволяющими автоматически подтверждать последовательность аминокислот в белке путем картирования пептидов, определять основные и второстепенные продукты реакций с высокой чувствительностью, автоматически количественно выявлять значимые интактные белки моноклональных антител, дифференцировать ключевые гликопептиды, анализировать белки клетки-хозяина, идентифицировать определенные токсины биологического происхождения в тканях макроорганизма и др.

Таким образом, развитие масс-спектрометрии является важным направлением в обеспечении биологической безопасности страны, обеспечивая эффективность клинично-диагностической деятельности, существенное повышение интенсивности и качества научных разработок по созданию новых средств диагностики, профилактики и лечения опасных инфекционных болезней.

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

Определение чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов рода *Klebsiella* методом MALDI-TOF MS

А.А.Самойлова¹, И.В.Лихачёв¹, Е.В.Зуева¹, Л.А.Краева^{1,2}, Е.В.Рогачёва¹, Н.В.Михайлов¹

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

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Современная микробиологическая диагностика инфекций, обусловленных *Klebsiella* spp., должна включать в себя выделение, идентификацию возбудителя и максимально быстрое определение чувствительности выделенного изолята к антимикробным препаратам (АМП). В ходе работы выполнена оценка перспективы использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения чувствительности штаммов *Klebsiella* spp. к АМП. По результатам масс-спектрометрии штаммов *Klebsiella* spp. на основе масс-спектров и данных о чувствительности исследуемых штаммов к АМП проведен кластерный анализ методом UPGMA, проанализированы полученные дендрограммы. Путем сопоставления масс-спектров чувствительной и резистентной культур при различных концентрациях АМП с помощью предложенного авторами метода выделены участки спектра с наибольшей вероятностью расположения маркеров антибиотикорезистентности. Таким образом, на основании проделанной работы может быть сформировано новое направление в оценке чувствительности *Klebsiella* spp. к антимикробным препаратам при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, *Klebsiella* spp., MALDI-TOF масс-спектрометрия

Для цитирования: Самойлова А.А., Лихачёв И.В., Зуева Е.В., Краева Л.А., Рогачёва Е.В., Михайлов Н.В. Определение чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов рода *Klebsiella* методом MALDI-TOF MS. Бактериология. 2020; 5(3): 8–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-8-13

Determination of sensitivity of microorganisms of the *Klebsiella* genus to antimicrobial drugs by the MALDI-TOF MS method

A.A.Samoilova¹, I.V.Likhachev¹, E.V.Zueva¹, L.A.Kraeva^{1,2}, E.V.Rogacheva¹, N.V.Mikhailov¹

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;

²S.M.Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russian Federation

Actual microbiological diagnostics of infections caused by *Klebsiella* spp. should include isolation of the strain, its identification and fastest possible determination of the pathogen susceptibility to antimicrobial agents. We evaluated the prospects of using MALDI-TOF mass spectrometry to determine the susceptibility of *Klebsiella* spp. strains to antimicrobial agents. According to the results of mass spectrometry *Klebsiella* spp. strains analysis, we carried out cluster analysis by the UPGMA method based on mass spectra and data on the susceptibility of the studied strains to antimicrobial agents, and then studied the obtained dendrograms. We identified the areas with the highest probability of the location of antibiotic resistance markers by comparing the mass spectra of susceptible and resistant microorganisms at different concentrations of antimicrobial agents. Thus, using MALDI-TOF mass spectrometry, a new direction in assessing the susceptibility of *Klebsiella* spp. to antimicrobial agents can be formed.

Key words: antibiotic resistance, *Klebsiella* spp., MALDI-TOF mass spectrometry

For citation: Samoilova A.A., Likhachev I.V., Zueva E.V., Kraeva L.A., Rogacheva E.V., Mikhailov N.V. Determination of sensitivity of microorganisms of the *Klebsiella* genus to antimicrobial drugs by the MALDI-TOF MS method. Bacteriology. 2020; 5(3): 8–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-8-13

Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова»

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

Телефон: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 10.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

For correspondence:

Liudmila A. Kraeva MD, PhD, DSc, head of the laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute, professor of the department of microbiology, S.M.Kirov Military Medical Academy

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

Phone: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 10.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

Микроорганизмы рода *Klebsiella* являются одними из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций [1] и входят в группу ESKAPE-патогенов – микроорганизмов, ассоциированных с повышенной антибиотикорезистентностью и представляющих собой серьезную проблему для здравоохранения [2, 3].

Традиционно представителей рода относят к условно-патогенным бактериям, однако данные микроорганизмы могут вызывать целый ряд различных инфекционных заболеваний: инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, инфекции кожи и мягких тканей, острые кишечные инфекции и инфекции мочевых путей, септицемии и т.д. [4, 5]. Штаммы *Klebsiella* spp., устойчивые к антимикробным препаратам (АМП), представляют серьезную проблему для практического здравоохранения [6, 7] и отнесены ВОЗ к группе возбудителей с «критически высоким уровнем приоритетности» [8]. Для инфекций, вызванных микроорганизмами рода *Klebsiella*, характерно тяжелое течение заболеваний. При инфекциях кровотока в течение месяца погибает 20% больных [9], а при нозокомиальных пневмониях – 50% [10].

Высокий уровень антибиотикорезистентности, а также способность штаммов *Klebsiella* spp. вызывать внутрибольничные вспышки свидетельствуют о необходимости получения информации о чувствительности клинического изолята в кратчайшие сроки для проведения адекватного этиотропного лечения [11, 12].

В настоящее время наиболее оптимальным методом для рутинной идентификации микроорганизмов рода *Klebsiella* является MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight – времяпролетная лазерная десорбционная ионизация, ассоциированная с матрицей) масс-спектрометрия, которая позволяет проводить типирование штаммов, относящихся к различным филогенетическим группам [13–15].

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии можно осуществлять анализ различных биополимеров: протеинов, липидов, нуклеиновых кислот, полисахаридов, входящих в состав бактериальной клетки. Большинство таких клеточных компонентов обладают уникальными спектральными характеристиками, которые позволяют идентифицировать

их в качестве маркеров, что является причиной интереса медицинской микробиологии к данной технологии [16]. MALDI-TOF позволяет осуществлять не только видовую идентификацию микроорганизмов, но и определять чувствительность культуры к АМП, а также выявлять факторы патогенности [16].

Цель исследования: оценка возможности использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для прогнозирования устойчивости *Klebsiella* spp. к различным АМП.

Материалы и методы

В ходе выполнения работы исследовали 195 клинических изолятов *Klebsiella* spp., которые были выделены из проб биологического материала от госпитализированных пациентов медицинских учреждений Санкт-Петербурга. Идентификацию данных изолятов до вида осуществляли при помощи MALDI-TOF MS с использованием спектрометра «Microflex LRF» и программного обеспечения «Biotyper RTC» (Bruker Daltonik, Германия). Значения Score $\geq 2,0$ использовали в качестве критерия надежной видовой идентификации.

Определение чувствительности клинических изолятов к АМП проводили диско-диффузионным методом в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2018-03) на среде агар Мюллера–Хинтон («Himedia», Индия). Клинические категории чувствительности исследуемых изолятов определяли в соответствии с рекомендациями EUCAST раздела «Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters» (версия 10.0, с 01.01.2020) и российскими клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2018-03).

В ходе определения чувствительности изолятов использовали 19 АМП, принадлежащих к следующим классам антибиотиков: аминогликозиды, хинолоны, бета-лактамы, в том числе пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы.

Для определения связи между кластерами была проведена иерархическая кластеризация полученных спектров с использованием алгоритма попарного арифметического

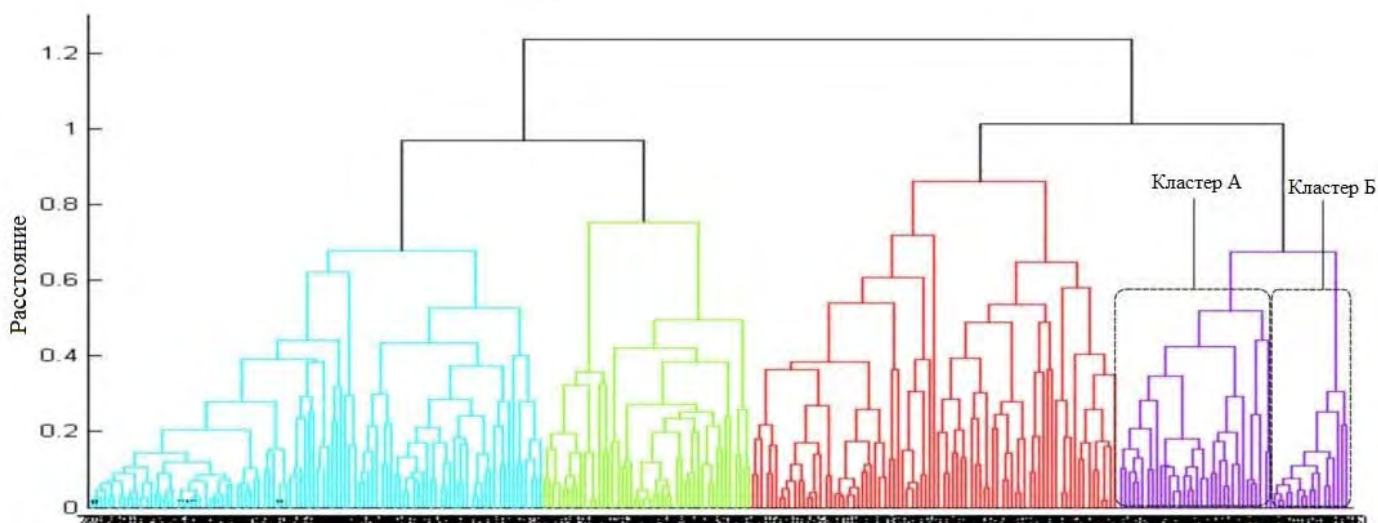


Рис. 1. Кластеризация штаммов на основе спектров.

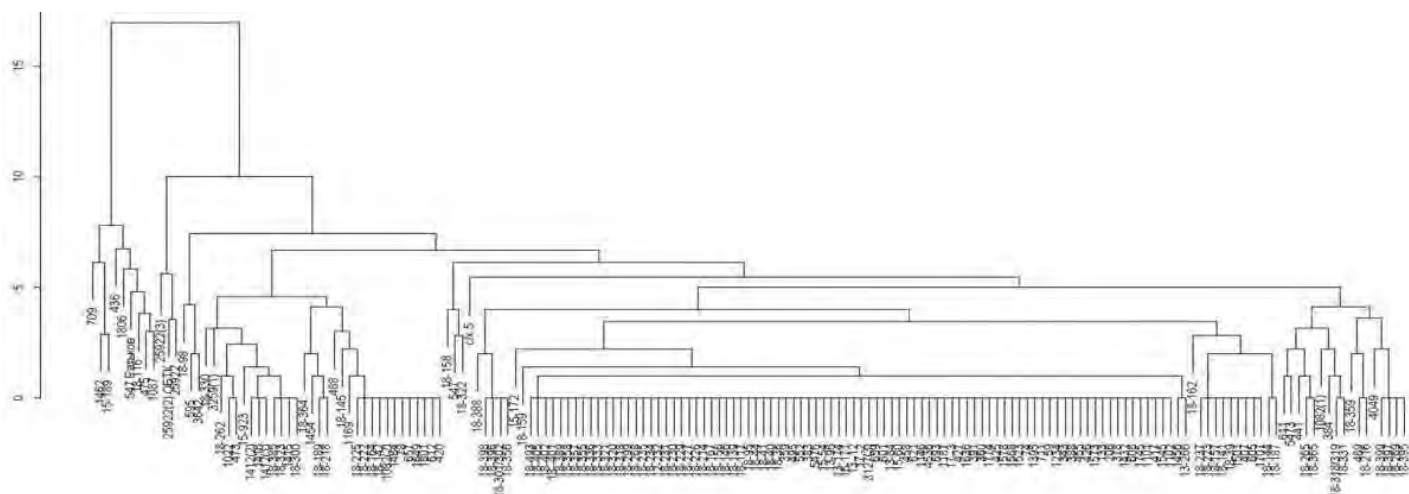


Рис. 2. Кластеризация штаммов на основании антибиотикочувствительности.

среднего (UPGMA). В работе использовали коэффициент корреляции Пирсона между переменными значениями интенсивности пиков в спектральных профилях в качестве меры расстояния между отдельными масс-спектрами.

Кластерный анализ и построение дендрограмм осуществляли с использованием инструментов MALDI «Biotyper RTC» 3.1 («Bruker Daltonik», Германия), «BioNumerics 6.6» («Applied Maths», Бельгия), языка программирования «R».

Результаты и обсуждение

По результатам масс-спектрометрии штаммов *Klebsiella* spp. проведен кластерный анализ методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA).

Как видно из рис. 1, масс-спектры штаммов сформировали 4 крупных кластера, разделенных на более мелкие. При

этом штаммы, схожие по признаку чувствительности к АМП, объединились в группу только в случае кластера А, который включал штаммы, резистентные ко всем исследуемым АМП, и кластера Б, включившего чувствительные штаммы (расстояние между кластерами – 0,65).

Группы, полученные в результате кластеризации, также проведенной методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) по признаку чувствительности к АМП (рис. 2), не были идентичны группам, кластеризованным по спектральным характеристикам. Причина различий заключалась в том, что кластеризация осуществляется по всем участкам спектра, а не только по тем, которые могут быть связаны с устойчивостью микроорганизма к АМП. Таким образом, предсказать антибиотикорезистентность только на основании кластеризации «сырых спектров» («raw spectra») исследуемых штаммов не представляется возможным.

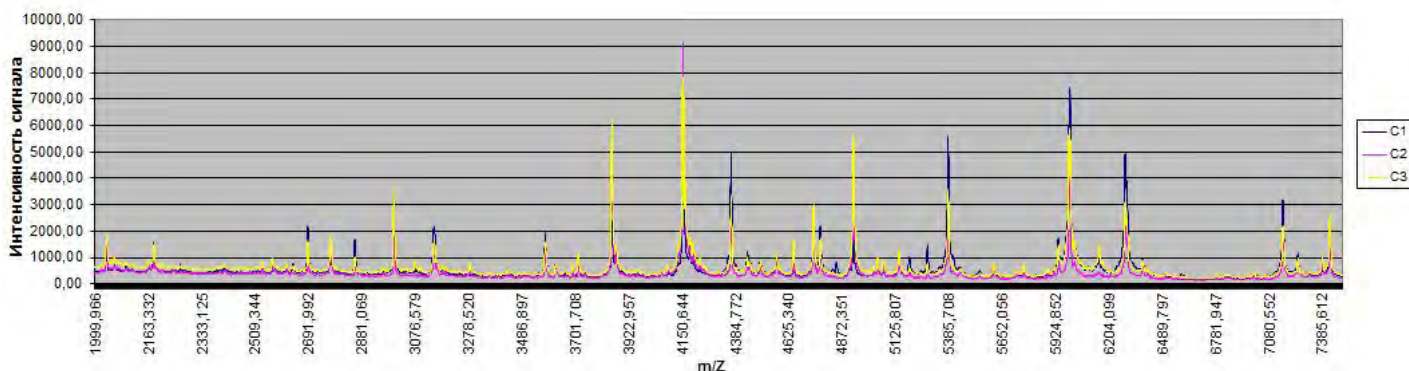


Рис. 3. Масс-спектры чувствительного штамма *Klebsiella* spp., полученные с участков с различными концентрациями антибиотика.

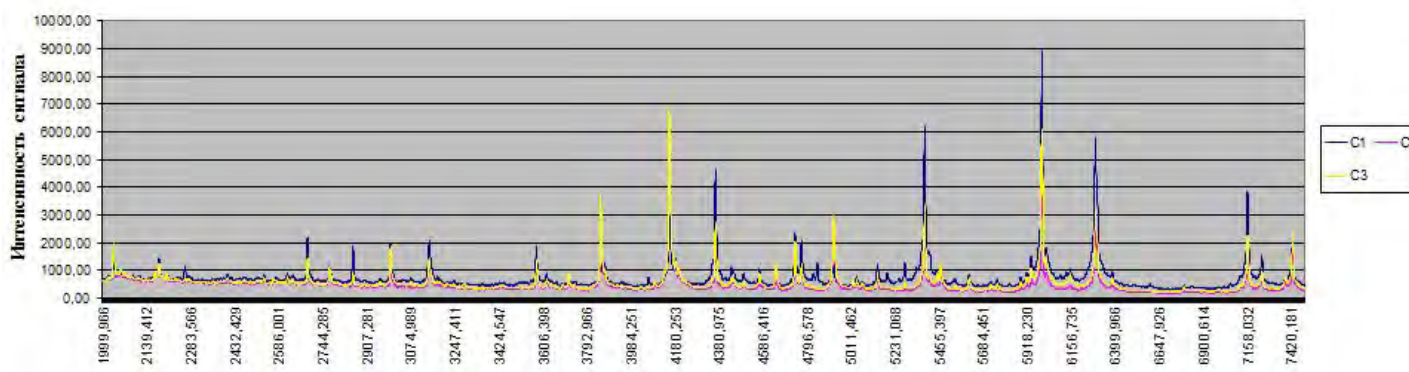


Рис. 4. Масс-спектры резистентного штамма *Klebsiella* spp., полученные с участков с различными концентрациями антибиотика.

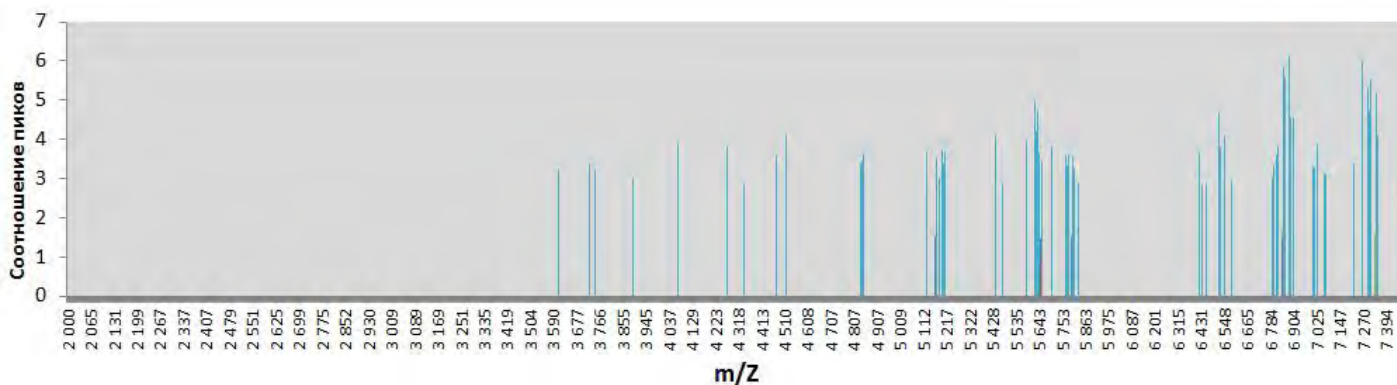


Рис. 5. Наиболее вероятные области локализации пиков, ответственных за резистентность к АМП.

Прогнозирование наличия какого-либо признака исследуемого изолята по масс-спектру возможно только при нахождении «маркерных пиков» – участков спектра, достоверно связанных с данным признаком (в нашем случае признак – чувствительность к АМП). Мы предлагаем алгоритм поиска наиболее вероятных участков расположения маркерных пиков, состоящий из следующих этапов:

1. Выделение на полученных масс-спектрах тех участков, которые могут быть связаны с дискриминантным признаком, то есть признаком, на основании которого делается вывод о принадлежности штамма к какой-либо группе. В нашем исследовании дискриминантным признаком являлась устойчивость микроорганизмов к АМП, поэтому мы исследовали резистентные штаммы.

2. Сравнение масс-спектров штаммов, обладающих дискриминантным признаком, со штаммами, которые не обладают данным признаком.

3. Сопоставление найденных на втором этапе различий с участками, с наибольшей вероятностью связанными с дискриминантным признаком (по результатам, полученным на первом этапе). Выделение достоверно различных участков, совпадающих с местами наиболее вероятного расположения дискриминантного признака на масс-спектре. На этих участках расположение маркерных пиков представляется наиболее вероятным.

4. Проверка достоверности связи найденных пиков с антибиотикочувствительностью штаммов.

Для проверки предложенного алгоритма на первом этапе исследования провели сравнение спектров микробных культур, выращенных при различных концентрациях АМП, с целью выявления участков спектра, в которых с наибольшей вероятностью располагаются пики, отвечающие за проявление антибиотикорезистентности.

На чашку Петри с питательной средой, засеянную исследуемой культурой микроорганизма (*Klebsiella* spp.), помещали диск с меропенемом, для которого осуществляли поиск маркеров резистентности. После инкубации культуры при 37°C в течение 24 ч отбирали пробу культуры в трех точках с различными концентрациями АМП: С₁ – максимальная концентрация АМП в питательной среде (культура отобрана на границе зоны роста), С₃ – минимальная концентрация АМП (культура отобрана у внутреннего края чашки Петри), С₂ – промежуточная концентрация (культура отобрана посередине между двумя предыдущими точками).

Далее проводили сравнение трех масс-спектров для чув-

ствительного и резистентного штаммов *Klebsiella* spp., полученных при исследовании микроорганизмов, взятых с участков среды с различной концентрацией АМП (рис. 3, 4).

При сопоставлении масс-спектров чувствительного и резистентного штаммов исключили совпадающие области (предположительно ответственные за неспецифические механизмы устойчивости). В итоге получили только те области, которые представляют наибольший интерес для поиска маркеров резистентности (рис. 5).

Применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения чувствительности к АМП, а именно для поиска маркеров резистентности, в настоящее время рассмотрено лишь в единичных работах, и пока не создано технологий его практического рутинного применения [18]. Описано применение MALDI-TOF MS для быстрого обнаружения поринов у *Klebsiella* spp. [19]. Авторы этой работы исследовали 5 карбапенем-чувствительных штаммов и 7 штаммов, устойчивых к карбапенемам. Белки внешней мембраны (OMP) экстрагировали и анализировали с помощью электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDS-PAGE) и затем с помощью MALDI-TOF MS. Предполагается, что пик примерно с m/z = 16кДа является 2H⁺-ионом моноизотопного пика 32 кДа, идентифицированного с помощью SDS-PAGE как белок OMP.

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии определена карбапенемазная активность бактерий порядка *Enterobacteriales* при помощи идентификации соединений карбапенемов и продуктов их распада [20]. Важнейшим преимуществом данной технологии являлась возможность определения активности бактериальных ферментов в отношении конкретной группы АМП, например β-лактамных антибиотиков [18]. Обнаружение маркеров резистентности к антибиотикам упрощается путем выделения участков спектра с наибольшей вероятностью их расположения с помощью предлагаемой методики выявления дискриминантных пиков.

Заключение

Таким образом, одновременно с идентификацией микроорганизмов при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии становится возможным прогнозирование чувствительности полученного изолята к АМП. Предлагаемый метод поиска дискриминантных пиков в перспективе может быть исполь-

зован для выявления маркеров, ответственных за резистентность микроорганизма к АМП. Перспектива использования результатов исследования состоит в сокращении времени исследования биологического материала от пациента и определения чувствительности к АМП выделенного микроорганизма.

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. Сухорукова МВ, Эйдельштейн МВ, Скленова ЕЮ, Иванчик НВ, Микотина АВ, Дехнич АВ, и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013–2014. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017;19(1):49-56.
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011
3. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. 2016;2016:2475067. DOI: 10.1155/2016/2475067
4. Скачкова ТС, Шипулина ОЮ, Шипулин ГА, Шеленков АА, Янушевич ЮГ, Михайлова ЮВ, и др. Изучение генетического разнообразия штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном медицинском центре г. Москвы, с помощью секвенирования нового поколения. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019;21(1):69-74.
5. Lin WH, Kao CY, Yang DC, Tseng CC, Wu AB, Teng CH, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Sep;33(9):1533-9. DOI: 10.1007/s10096-014-2100-4
6. Покудина ИО, Коваленко КА. Распространённость и вклад в антибиотикостойчивость β-лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016;12(2):295–298.
7. Анганова ЕВ, Распопина ЛВ, Ветехина АВ, Духанина АВ. Антибиотикостойчивость *Klebsiella pneumoniae* к препаратам цефалоспоринового ряда. Acta Biomedica Scientifica. 2017;2(4):43-47.
8. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (2017). The first ever list of WHO cataloging clinically relevant multidrug-resistant pathogens in order of priority, according to the current threat to human health, for urgent research and development of new antibiotics. Available at: www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/
9. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallares R, Dominguez MA, Linares J, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains causing bloodstream infections in adults. Microb Drug Resist. 2018;24(7):949957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
10. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
11. Шамина ОВ, Крыжановская ОА, Лазарева АВ, Поликарпова СВ, Карасёва ОВ, Чеботарь ИВ, Маянский НА. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(10):646-650. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-646-650
12. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and metaanalysis of mortality of patients infected with carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):18. DOI: 10.1186/s1294101701913
13. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, et al. Biotyping of multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDITOF MS. PloS One. 2013;8(4):e61428. DOI: 10.1371/journal.pone.0061428
14. Rodrigues C, Novais A, Sousa C, Ramos H, Coque TM, Canton R, et al. Elucidating constraints for differentiation of major human *Klebsiella pneumoniae* clones using MALDITOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(2):379386. DOI: 10.1007/s1009601628128
15. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDITOF mass spectrometry. Front Microbiol. 2018;9:3000. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03000
16. Бочарова ЮА, Чеботарь ИВ, Маянский НА. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(4):249-256. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256
17. Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, et al. The Technical and Biological Reproducibility of MatrixAssisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study. PLoS ONE. 2016; 11(10): e0164260. DOI:10.1371/journal.pone.0164260
18. Припутневич ТВ, Мелкумян АР. Масс-спектрометрия – новое слово в клинической микробиологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(12):842-848. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848
19. Cai J, Hu Y, Zhang R, Zhou H, Xiang G. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2012 Jun; 50(6): 2179-82. DOI: 10.1128/JCM.00503-12
20. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β-lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):924-30. DOI: 10.1128/JCM.02691-13

References

1. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EYu, Ivanchik NV, Mikotina AV, Dekhnich AV, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "Marathon" 2013–2014. Clinical Microbiology and antimicrobial Chemotherapy. 2017;19(1):49-56. (In Russian).
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011
3. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. 2016;2016:2475067. DOI: 10.1155/2016/2475067
4. Skachkova TS, Shipulina OYu, Shipulin GA, Shelenkov AA, Yanushevich YuG, Mikhaylova YuV, et al. Characterization of genetic diversity of the *Klebsiella pneumoniae* strains in a Moscow tertiary care center using next-generation sequencing. Clinical Microbiology and antimicrobial Chemotherapy. 2019;21(1):69-74. (In Russian).
5. Lin WH, Kao CY, Yang DC, Tseng CC, Wu AB, Teng CH, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Sep;33(9):1533-9. DOI: 10.1007/s10096-014-2100-4

6. Pokudina IO, Kovalenko KA. The prevalence and contributing to antibiotic-resistant of β -lactamases in ambulatory isolates *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2016;12(2):295–298. (In Russian).
7. Anganova EV, Raspopina LA, Vetokhina AV, Dukhanina AV. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* to cephalosporins. Acta Biomedica Scientifica. 2017;2(4):43–47. (In Russian).
8. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (2017). The first ever list of WHO cataloging clinically relevant multidrug-resistant pathogens in order of priority, according to the current threat to human health, for urgent research and development of new antibiotics. Available at: www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/
9. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallares R, Dominguez MA, Linares J, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains causing bloodstream infections in adults. Microb Drug Resist. 2018;24(7):949957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
10. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
11. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Polikarpova SV, Karaseva OV, Chebotar IV, Mayanskiy NA. The comparison of methods for determination of colistin susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2018;63(10):646–650. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-646-650 (In Russian).
12. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and metaanalysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):18. DOI: 10.1186/s1294101701913
13. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Riche H, Landraud L, et al. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One. 2013;8(4):e61428. DOI: 10.1371/journal.pone.0061428
14. Rodrigues C, Novais A, Sousa C, Ramos H, Coque TM, Canton R, et al. Elucidating constraints for differentiation of major human *Klebsiella pneumoniae* clones using MALDI-TOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(2):379386. DOI: 10.1007/s1009601628128
15. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. Front Microbiol. 2018;9:3000. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03000
16. Bocharova YuA, Chebotar IV, Mayanskiy NA. The possibilities, problems and perspectives of mass-spectrometry in medical microbiology: publications review. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(4):249–256. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256 (In Russian).
17. Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, et al. The Technical and Biological Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study. PLoS ONE. 2016; 11(10): e0164260. DOI:10.1371/journal.pone.0164260
18. Pripitnevich TM, Melkumyan AR. The mass-spectrometry as a new word in clinical microbiology. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(12):842–848. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848
19. Cai J, Hu Y, Zhang R, Zhou H, Xiang G. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2012 Jun; 50(6): 2179–82. DOI: 10.1128/JCM.00503-12
20. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):924–30. DOI: 10.1128/JCM.02691-13

Информация об авторах:

Самойлова Анна Андреевна, младший научный сотрудник отдела новых технологий ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
 Телефон: (812) 233-2092
 E-mail: samanta1906@mail.ru

Лихачёв Иван Владимирович, младший научный сотрудник отдела новых технологий ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
 Телефон: (812) 233-2092
 E-mail: liv-dnt@mail.ru

Зуева Елена Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
 Телефон: (812) 233-2092
 E-mail: elenazueva9@gmail.com

Рогачёва Елизавета Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
 Телефон: (812) 233-2092
 E-mail: elizvla@yandex.ru

Михайлов Николай Венерович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
 Телефон: (812) 233-2092
 E-mail: mnv63@yandex.ru

Information about authors:

Anna A. Samoilova, junior researcher, department of new technologies, Saint Petersburg Pasteur Institute
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation
 Phone: (812) 233-2092
 E-mail: samanta1906@mail.ru

Ivan V. Likhachev, junior researcher, department of new technologies, Saint Petersburg Pasteur Institute
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation
 Phone: (812) 233-2092
 E-mail: liv-dnt@mail.ru

Elena V. Zueva, PhD (Biological Sciences), senior researcher, laboratory of molecular immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation
 Phone: (812) 233-2092
 E-mail: elenazueva9@gmail.com

Elizaveta V. Rogacheva, junior researcher, laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation
 Phone: (812) 233-2092
 E-mail: elizvla@yandex.ru

Nikolay V. Mikhailov, MD, PhD, senior researcher at the Saint Petersburg Pasteur Institute
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation
 Phone: (812) 233-2092
 E-mail: mnv63@yandex.ru

Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба от близкородственных бацилл

И.В.Бахтеева¹, В.В.Каптелова², Г.М.Титарева¹, Т.Б.Кравченко¹, Ю.О.Гончарова¹, К.В.Хлопова¹, В.С.Тимофеев¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», Москва, Российская Федерация

Bacillus anthracis – грамположительная спорообразующая бактерия, способная вызывать сибирскую язву, особо опасное заболевание теплокровных животных. Индикация *B. anthracis* и дифференциация этого патогена от близкородственных бацилл зачастую осложняется высокой степенью их родства, что приводит к схожести генетических и фенотипических признаков. В данной работе мы предлагаем набор олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для детекции трех видоспецифических для *B. anthracis* хромосомных локусов в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Предлагаемый набор олигонуклеотидов позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать *B. anthracis* без оглядки на плазмидный профиль штамма и дифференцировать *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов, даже обладающих атипичными генетическими свойствами.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, ПЦР, видовая диагностика

Для цитирования: Бахтеева И.В., Каптелова В.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Гончарова Ю.О., Хлопова К.В., Тимофеев В.С. Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба от близкородственных бацилл. Бактериология. 2020; 5(3): 14–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-14-24

Prototype of a multiplex PCR test system for differentiation of anthrax microbe from close-kinded bacilles

I.V.Bakhteeva¹, V.V.Kaptelova², G.M.Titareva¹, T.B.Kravchenko¹, Yu.O.Goncharova¹, K.V.Khlopova¹, V.S.Timofeev¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Bacillus anthracis is a Gram-positive spore-forming bacterium capable of causing anthrax, a particularly dangerous disease of warm-blooded animals. The indication of *B. anthracis* is often complicated by the high genetic similarity between *B. anthracis* and some closely related *Bacillus* species. In present work, we propose a set of oligonucleotide primers and Taq-man probes intended for simultaneous detection of three high-specific for *B. anthracis* chromosomal loci in multiplex PCR. The proposed set of oligonucleotides makes it possible to identify *B. anthracis* with a high degree of certainty without regard to the plasmid profile of the strain and to differentiate *B. anthracis* from closely related microorganisms, even those with atypical genetic properties.

Key words: *Bacillus anthracis*, PCR, species diagnostics

For citation: Bakhteeva I.V., Kaptelova V.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Goncharova Yu.O., Khlopova K.V., Timofeev V.S. Prototype of a multiplex PCR test system for differentiation of anthrax microbe from close-kinded bacilles. Bacteriology. 2020; 5(3): 14–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-14-24

Для корреспонденции:

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: bahtejeva@mail.ru

Статья поступила 09.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

For correspondence:

Irina V. Bakhteeva, MD, PhD, senior researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: bahtejeva@mail.ru

The article was received 09.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

Сибирская язва – особо опасное заболевание животных и человека, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Главным образом оно распространено среди копытных млекопитающих, но может поражать и других теплокровных животных, в том числе и человека. В настоящее время сибирская язва редка в большинстве развитых стран [1] и представляет собой проблему преимущественно для субсахарской Африки и некоторых регионов Азии [2–4]. Но еще недавно, вплоть до разработки противосибиреязвенных вакцин, внедрения массовой вакцинации сельскохозяйственных животных и контактирующих с ними людей и санитарно-эпидемиологических правил по предотвращению распространения заболеваний, эта болезнь была широко распространена по всему цивилизованному миру, как минимум в регионах, где практикуют крупностадное скотоводство.

Благодаря высокой сохранности эндоспор *B. anthracis* в почве старые почвенные очаги (места гибели животных от сибирской язвы и места их захоронения) могут представлять эпидемическую опасность даже спустя многие десятилетия. Они могут активизироваться вследствие тех или иных геологических и климатических процессов – локального потепления, движения почвы, подъема грунтовых вод – или же при ошибках санитарного надзора, таких как отмена вакцинации сельскохозяйственных животных. Благодаря этому вспышки сибирской язвы время от времени происходят даже в развитых странах, в регионах, где это заболевание не встречалось десятилетиями [4–6]. Поэтому вопрос быстрой и точной диагностики сибирской язвы и идентификации *B. anthracis* в клинических и полевых образцах остается актуальным и для благополучных по сибирской язве стран. Но идентификация этого микроорганизма во многом затрудняется его таксономическим положением. *B. anthracis* является членом группы *Bacillus cereus sensu lato* или *Bacillus cereus complex*, которая также включает другие виды бацилл: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*. Ключевая особенность этой группы видов – очень высокая степень генетической близости между ними, которая позволяет считать их генетическими вариантами одного вида [7]. Кроме того, высокое генетическое сходство облегчает горизонтальную передачу генов в рамках всей группы, даже через межвидовой барьер. По результатам некоторых исследований [8], более четверти исследованных геномов *B. cereus sensu lato* несут следы межвидового горизонтального переноса генов – фрагменты ДНК близкородственных микроорганизмов. Генетическая схожесть видов *B. cereus sensu lato* и высокий шанс присутствия в геноме тестируемого штамма генов другого вида затрудняет индикацию отдельных видов из этой группы и дифференциацию видов между собой как молекулярно-генетическими, так и традиционными культурально-микробиологическими методами. Но все же, несмотря на указанные сложности, к настоящему моменту разработан ряд методов индикации *B. anthracis*. Из них наибольший интерес для практического применения представляет идентификация методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), так как этот метод высокочувствительный, быстрый и, что немаловажно, не требует работы с живыми культурами возбудителей, что позволяет проводить анализ

даже лабораториям, не оборудованным для работы с патогенными микроорганизмами.

Большинство разработанных, лицензированных и коммерчески доступных ПЦР-тест-систем для идентификации сибиреязвенного микроба используют в качестве геномишеней уникальные маркеры, кодирующие сибиреязвенный токсин и капсулу и локализованные на плаزمиде вирулентности рХО1 и рХО2 соответственно. Эти плазмиды считаются видоспецифичными для *B. anthracis*, именно благодаря им *B. anthracis* способен вызывать сибирскую язву, и их наличие в исследуемом материале однозначно сигнализирует о присутствии эпидемически значимого штамма, без оглядки на особенности его таксономического положения, чего более чем достаточно для нужд клинической диагностики.

Но существуют изоляты *B. anthracis*, утерявшие эти плазмиды [9–14]. В частности, *B. anthracis* теряет плазмиды при развитии в почве [15]. В этом случае потеря плазмид только частью популяции в пределах одного почвенного очага при использовании ПЦР-тестов, нацеленных на выявление плазмидных маркеров, может привести к ложноотрицательным результатам анализа на *B. anthracis*. Но при этом в почвенном очаге, из которого была отобрана анализируемая проба, могут сохраняться клетки, сохранившие исходный плазмидный профиль и, соответственно, вирулентность. И это может привести к вспышке заболевания при вовлечении данного очага, признанного по результатам исследований эпидемиологически безопасным, в сферу хозяйственной деятельности [9, 16].

Кроме того, существуют штаммы *B. cereus*, обладающие рХО-подобными плазмидами, или гомологами генов плазмиды рХО2 в гетерологичных плаزمиде [10]. Очевидно, что такие штаммы по результатам ПЦР-анализа наличия плазмид рХО1 и рХО2 могут быть отнесены к виду *B. anthracis*, несмотря на несопоставимо меньшую эпидемическую опасность, как минимум для людей и сельскохозяйственных животных.

Таким образом, несмотря на всю привлекательность идеи использования в качестве ПЦР-мишеней плазмид рХО1 и рХО2, этот подход может оказаться недостаточным, особенно когда речь идет не о клинической диагностике, а об исследовании почвенных образцов или микроорганизмов с нетипичным плазмидным профилем и/или спорным таксономическим положением. В этих случаях исследователи вынуждены использовать хромосомные ПЦР-маркеры.

В целом ряде исследований в качестве хромосомных мишеней для ПЦР-детекции сибиреязвенного микроба применялись ДНК-маркеры, используемые для генотипирования *B. anthracis*, например тандемный повтор *virA* [17–19], ген *AC-390* [20] и локус SG-850/749 [21], локусы BA813 [22–29], BA5510 [30], гены *bclB* [31], *sap* [32], *saspB* [33, 34] и *sspE* [35, 36], гены спорового белка В-типа (smallacid-soluble spore protein – SASP), белка гликозилтрансферазной группы [37, 38], гомолога абгидролазы [24], профаговые регионы [23] – BA5345 [39], BA5357 [40] и PL3 [41], видоспецифичные однонуклеотидные замены (SNP) в маркерах, общих для всех или нескольких видов из группы *B. cereus sensu lato*, например SNP в генах *rpoB* [22, 42–45], *gyrA* [46–48], *gyrB* [49, 50], *plcR* [51, 52], *purA* [53], а также некоторые регионы рибосомаль-

ной ДНК [21, 54, 55] и другие мишени. Но в этом случае приходится сталкиваться с упомянутыми выше генетической мономорфностью *B. cereus sensu lato* и легкостью горизонтального генетического переноса в рамках этой группы, затрудняющими дифференциацию отдельных видов в рамках всей группы. В этой ситуации для повышения достоверности результатов ПЦР-анализа можно использовать два подхода: 1) использование ПЦР-мишеней с наименьшей вероятностью ложноположительных и ложноотрицательных результатов, то есть наибольшей видоспецифичностью; 2) использование нескольких ПЦР-мишеней для их одновременной детекции в одной мультиплексной реакции. Лучшим решением является объединение этих двух подходов, то есть одновременное детектирование нескольких высокоспецифичных ПЦР-мишеней.

Цель данной работы – представить результаты разработки и испытания мультиплексной ПЦР-тест-системы для выявления сибиреязвенного микроба и его дифференциации от близкородственных бацилл, включающей три хромосомных маркера с высокой специфичностью.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовано 130 штаммов *B. anthracis* и 20 штаммов близкородственных микроорганизмов – 10 штаммов *B. cereus*, 2 штамма *B. cereus* bv. anthracoid, 1 штамм *B. licheniformis*, 1 штамм *B. megaterium*, 3 штамма *B. subtilis*, 3 штамма *B. thuringiensis* (табл. 1).

Среды и условия культивирования. Бациллярные штаммы выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде LB Broth; Miller (Luria-Bertani) (Amresco, США).

Анализ *in silico*. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов целевых генов проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчет их температур плавления, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов и их гомологов, а также их фрагментов проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation). Для анализа *in silico* было использовано 133 аннотированных генома бациллярных штаммов, депонированных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Выделение нуклеиновых кислот. Препараты тотальной ДНК из бактерий получали с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США). Все манипуляции проводились согласно инструкциям производителя.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили с помощью амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), с использованием «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя SYBR Green I» и «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ» (Синтол, Россия, Москва).

Состав реакционной смеси: «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя

SYBR Green I» или «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ» – 10 мкл, 25мМ раствор MgCl₂ – 2,5 мкл, праймеры – по 10 пкМоль, TaqMan-зонды – по 5 пкМоль, H₂O – до 25 мкл.

Детекцию продуктов амплификации проводили по каналам FAM/SYBR, HEX, ROX. Положительным результатом анализа считали пробы, которые детектировались до 35-го цикла. Оптимизацию температурного профиля реакции проводили с использованием температурного градиента на стадии гибридизации, с шагом 1°C. Оптимальной температурой считали ту, при которой кривые амплификации на стадии экспоненциального нарастания сигнала в большей степени приближались к идеальной кривой, описываемой уравнением $N_n = N_0 2^n$,

где n – номер цикла реакции; N_0 – количество целевых молекул в начале реакции (на первом цикле); N_n – количество продуктов реакции на цикле n ; 2 – коэффициент эффективности идеальной ПЦР, отражающий удвоение количества продуктов реакции в каждом последующем цикле.

Оптимальный режим амплификации для индивидуальных ПЦР: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с, считывание флуоресценции по каналу SYBR.

Оптимальный режим амплификации для мультиплексной ПЦР: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 67°C – 30 с, считывание флуоресценции по каналам FAM, ROX, HEX.

При необходимости продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле («Sigma» США) в 1хTAE-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) и детекцией с использованием трансиллюминатора ECX-15.L при длине волны 365 нм (Vilber Lourmat, Франция).

Олигонуклеотидные праймеры и зонды (табл. 2, 3) были синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Результаты и обсуждение

Подбор ПЦР-мишеней

Первым этапом работы являлся выбор генов-мишеней, наиболее видоспецифичных для *B. anthracis*. Современные аппаратные платформы для ПЦР в реальном времени позволяют проводить учет по нескольким оптическим каналам и тем самым дают возможность детектировать в одной мультиплексной реакции несколько мишеней одновременно. Но при этом, хотя на рынке широко представлены амплификаторы, позволяющие детектировать флуоресценцию по 5 и даже 6 оптическим каналам, для некоторых распространенных амплификаторов (например, «LightCycler 96» производства Roche, Швейцария) количество одновременно считываемых каналов ограничено четырьмя. Кроме того, при разработке прототипа ПЦР-тест-системы один из каналов желательно использовать не для детекции специфической мишени, а для постановки внутреннего контроля (обычно для этого вносят в реакционную смесь ДНК-матрицу, неомологичную целевым мишеням, и комплементарные этой матрице олигонуклеотиды – праймеры и флуоресцентно меченный зонд, наличие сигнала по соответствующему каналу свидетельствует о работоспособности ПЦР-смеси даже при отсутствии амплификации целевых локусов). Поэтому, имея в виду возможность работы на 4-канальных амплифи-

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

№ п/п	Вид	Штамм	№ п/п	Вид	Штамм	№ п/п	Вид	Штамм
1	<i>B. anthracis</i>	24	51	<i>B. anthracis</i>	157(B-1107)	101	<i>B. anthracis</i>	71/12
2	<i>B. anthracis</i>	30	52	<i>B. anthracis</i>	174(3v)	102	<i>B. anthracis</i>	73/42
3	<i>B. anthracis</i>	41	53	<i>B. anthracis</i>	174ст(3-706)	103	<i>B. anthracis</i>	737/10
4	<i>B. anthracis</i>	42	54	<i>B. anthracis</i>	17JB	104	<i>B. anthracis</i>	8(2099)
5	<i>B. anthracis</i>	44	55	<i>B. anthracis</i>	191(11-51)	105	<i>B. anthracis</i>	81(638)
6	<i>B. anthracis</i>	63	56	<i>B. anthracis</i>	193(11-52)	106	<i>B. anthracis</i>	81/1
7	<i>B. anthracis</i>	228	57	<i>B. anthracis</i>	219/6	107	<i>B. anthracis</i>	819/5
8	<i>B. anthracis</i>	357	58	<i>B. anthracis</i>	25/71	108	<i>B. anthracis</i>	820/11
9	<i>B. anthracis</i>	358	59	<i>B. anthracis</i>	272/103-Д	109	<i>B. anthracis</i>	822/7
10	<i>B. anthracis</i>	1173	60	<i>B. anthracis</i>	28/83	110	<i>B. anthracis</i>	827/43
11	<i>B. anthracis</i>	1175	61	<i>B. anthracis</i>	283/3002	111	<i>B. anthracis</i>	837/1922
12	<i>B. anthracis</i>	1177	62	<i>B. anthracis</i>	298/22	112	<i>B. anthracis</i>	888/73
13	<i>B. anthracis</i>	1179	63	<i>B. anthracis</i>	300/31	113	<i>B. anthracis</i>	914/213
14	<i>B. anthracis</i>	1183	64	<i>B. anthracis</i>	331/214	114	<i>B. anthracis</i>	940/16
15	<i>B. anthracis</i>	1184	65	<i>B. anthracis</i>	34(738)	115	<i>B. anthracis</i>	M164
16	<i>B. anthracis</i>	1187	66	<i>B. anthracis</i>	34F2 (Sterne)	116	<i>B. anthracis</i>	A-2/3.54
17	<i>B. anthracis</i>	1189	67	<i>B. anthracis</i>	35(1529)	117	<i>B. anthracis</i>	A-204
18	<i>B. anthracis</i>	1191	68	<i>B. anthracis</i>	367/17	118	<i>B. anthracis</i>	A-205
19	<i>B. anthracis</i>	1198	69	<i>B. anthracis</i>	388/1	119	<i>B. anthracis</i>	A-206
20	<i>B. anthracis</i>	1199	70	<i>B. anthracis</i>	401/109	120	<i>B. anthracis</i>	A-211
21	<i>B. anthracis</i>	1207	71	<i>B. anthracis</i>	427/618	121	<i>B. anthracis</i>	И-271
22	<i>B. anthracis</i>	1214	72	<i>B. anthracis</i>	46/27	122	<i>B. anthracis</i>	И-29
23	<i>B. anthracis</i>	1259	73	<i>B. anthracis</i>	47/28	123	<i>B. anthracis</i>	И-362
24	<i>B. anthracis</i>	1261	74	<i>B. anthracis</i>	48/29	124	<i>B. anthracis</i>	И-363
25	<i>B. anthracis</i>	1264	75	<i>B. anthracis</i>	49/30	125	<i>B. anthracis</i>	И-364
26	<i>B. anthracis</i>	1265	76	<i>B. anthracis</i>	5(Тула)	126	<i>B. anthracis</i>	И-366
27	<i>B. anthracis</i>	1266	77	<i>B. anthracis</i>	50/31	127	<i>B. anthracis</i>	M-29(M-1)
28	<i>B. anthracis</i>	1269	78	<i>B. anthracis</i>	513/1	128	<i>B. anthracis</i>	M-71-R
29	<i>B. anthracis</i>	1273	79	<i>B. anthracis</i>	52/33	129	<i>B. anthracis</i>	M-71-S
30	<i>B. anthracis</i>	1284	80	<i>B. anthracis</i>	531/17	130	<i>B. anthracis</i>	СТИ-1
31	<i>B. anthracis</i>	1286	81	<i>B. anthracis</i>	537/38	131	<i>B. cereus</i>	55
32	<i>B. anthracis</i>	1298	82	<i>B. anthracis</i>	54(Ч-7)	132	<i>B. cereus</i>	56
33	<i>B. anthracis</i>	8189	83	<i>B. anthracis</i>	542/151	133	<i>B. cereus</i>	57
34	<i>B. anthracis</i>	05.январь	84	<i>B. anthracis</i>	546/714	134	<i>B. cereus</i>	164
35	<i>B. anthracis</i>	53169	85	<i>B. anthracis</i>	555/288	135	<i>B. cereus</i>	1070
36	<i>B. anthracis</i>	53170	86	<i>B. anthracis</i>	560/258	136	<i>B. cereus</i>	5832
37	<i>B. anthracis</i>	1(#14)	87	<i>B. anthracis</i>	566/762	137	<i>B. cereus</i>	9634
38	<i>B. anthracis</i>	1(СО)	88	<i>B. anthracis</i>	57/25(СТ-57)	138	<i>B. cereus</i>	10702
39	<i>B. anthracis</i>	10(38 Калыга)	89	<i>B. anthracis</i>	57/38	139	<i>B. cereus</i>	504 (B-1447)
40	<i>B. anthracis</i>	1020/11	90	<i>B. anthracis</i>	582/532	140	<i>B. cereus</i> <i>bv.</i> <i>anthracoid</i>	212
41	<i>B. anthracis</i>	1020/213	91	<i>B. anthracis</i>	589/47	141	<i>B. cereus</i> <i>bv.</i> <i>anthracoid</i>	6691
42	<i>B. anthracis</i>	1038/311	92	<i>B. anthracis</i>	592/10	142	<i>B. cereus</i> <i>bv.</i> <i>anthracoid</i>	Dakkar
43	<i>B. anthracis</i>	1051(35)	93	<i>B. anthracis</i>	596/9	143	<i>B. licheniformis</i>	B-1411
44	<i>B. anthracis</i>	1055/38	94	<i>B. anthracis</i>	61(1017)	144	<i>B. megaterium</i>	B-1435
45	<i>B. anthracis</i>	1056/51	95	<i>B. anthracis</i>	611/76-91	145	<i>B. subtilis</i>	168
46	<i>B. anthracis</i>	11(1940)	96	<i>B. anthracis</i>	614/1	146	<i>B. subtilis</i>	B-1405
47	<i>B. anthracis</i>	1168/6-102	97	<i>B. anthracis</i>	63/112	147	<i>B. subtilis</i>	niger
48	<i>B. anthracis</i>	13/39	98	<i>B. anthracis</i>	644/268	148	<i>B. thuringiensis</i>	214
49	<i>B. anthracis</i>	15(1345)	99	<i>B. anthracis</i>	68/12	149	<i>B. thuringiensis</i>	1373
50	<i>B. anthracis</i>	15/47	100	<i>B. anthracis</i>	7(992)	150	<i>B. thuringiensis</i>	g7566

Таблица 2. Последовательности праймеров

Ген-мишень	Последовательность прямого праймера 5'→3'	Последовательность обратного праймера 5'→3'
γ Phage Receptor	GCGAATACAGTACATATTACGTTTGTGTAACAAG	ACAAAGCGGAAAACAACAACATCTCCAG
Va 5357	CACCCAGCGGAACATGGG	GTAGTCACGCCATGACTTGATGTGATG
PlcR	GCGCATTATACTTGGACAATCAATACGCAT	CGAAAAAGAAGTAAGCTTTTTTCGTAAGCATC

Таблица 3. Последовательности зондов

Ген-мишень	Последовательность зонда 5'→3'	Флуоресцентная метка
γ Phage Receptor	AGCCCCGGCCATTAAGCCATCAATG	FAM
Va 5357	TGTCATTGACCGAGACGCTGGGCA	ROX
PlcR	TCTGCTCTATCACACTCTAGCTTTTCTAGGCATTCAACT	HEX

каторах и необходимость зарезервировать один канал из четырех для внутреннего контроля амплификации, мы вынуждены ограничиться лишь тремя ПЦР-мишенями. Столь небольшое число мишеней только подчеркивает необходимость выбора в их качестве наиболее видоспецифических для *B. anthracis* локусов.

Мы далеко не первые, кто поставил перед собой подобную задачу, поэтому у нас была возможность учесть результаты, полученные другими исследователями. Например, достаточно полный анализ специфичности хромосомных не-однонуклеотидных маркеров был проведен в работе Agren J. et al. [56], авторами которой было выявлено, что из широкого спектра потенциальных ПЦР-мишеней лишь профаговые локусы VA5345 [39, 57], PL3 [41] и VA5357 [40] обладали необходимой специфичностью. Последовательности праймеров/зондов к указанным локусам показали идеальную гомологию со всеми геномами *B. anthracis* и низкий уровень гомологии с геномами *B. thuringiensis* и *B. cereus*, включая штаммы, филогенетически тесно связанные с *B. anthracis*. Из однонуклеотидных маркеров только нонсенс-мутация (⁶⁴⁰G→T) глобального регулятора транскрипции факторов вирулентности *plcR* оказалась видоспецифичной для *B. anthracis* [51]. Исходя из результатов этих работ, мы выбрали первыми двумя ПЦР-мишенями профаговый регион VA5345 и ген *plcR*. В качестве третьей мишени мы выбрали ген белка-рецептора диагностического фага Gamma, предложенный нами ранее для ПЦР-идентификации сибиреязвенного микроба и показавший достаточно высокую специфичность [58].

Профаговый регион Va5357. Проведенный нами BLAST-анализ показал, что в геномах близкородственных бацилл данный локус или даже сколько-либо протяженные участки с аналогичными последовательностями отсутствуют. Это дало нам возможность сконструировать пару видоспецифичных для *B. anthracis* праймеров и флуоресцентно меченный зонд, комплементарные данному локусу, указанные в табл. 2, 3.

Регулятор транскрипции PlcR. Экспрессия многих генов у *B. cereus* и *B. thuringiensis*, в том числе их факторов патогенности, находится под контролем регулятора транскрипции *PlcR* [59]. У *B. anthracis* *PlcR* инактивирован в результате мутации ⁶⁴⁰G→T гена *plcR*, приводящей к замене триплета GAA на стоп-кодон TAA [60]. Хотя эта мутация и видоспецифична, использование ее в качестве ПЦР-мишени не распространено, в первую очередь из-за технических слож-

ностей, возникающих при детекции однонуклеотидных замен. Действительно, некомплементарность лишь одного нуклеотида обычно недостаточно снижает эффективность гибридизации олигонуклеотида с матрицей и эффективность последующей амплификации. Поэтому зачастую для детекции SNP используют конкурентную ПЦР, при которой за связывание с матрицей, содержащей SNP конкурируют два олигонуклеотида, 3'-концевой нуклеотид которых комплементарен одному из аллельных состояний SNP. Для определения того, с каким из этих олигонуклеотидов более эффективно происходит гибридизация матричной ДНК, то есть какая аллель в ней присутствует, эти олигонуклеотиды метят, например, разными флуоресцентными метками, или один из них метят GC-богатой последовательностью на 5'-конце, и определяют сравнительную эффективность включения этих двух олигонуклеотидов в ПЦР по соответствующему оптическому каналу амплификатора или по кривым плавления продукта амплификации. В любом случае такой подход для детекции однонуклеотидной замены не позволяет использовать ее как мишень для мультиплексной ПЦР. Для того, чтобы обойти это ограничение, мы сконструировали прямой праймер, 3'-концевой нуклеотид которого комплементарен видоспецифичной для *B. anthracis* мутации и в последовательность которого мы дополнительно ввели искусственную замену A→C в -3-положении с 3'-конца, некомплементарную ни одному из аллелей гена *plcR*, доступных в GenBank, в расчете на то, что некомплементарные нуклеотиды в положениях 1 и 3 с 3'-конца праймера помешают Taq-полимеразе эффективно связаться с димером праймер-матрицы и начать элонгацию [61] в случае, когда матрицей выступает ДНК неантрацидных видов бацилл. Для повышения расчетной температуры отжига праймера были заменены два 5'-концевых нуклеотида с AA на GC. В итоге прямой видоспецифический праймер имел последовательность GCGCATTATACTTGGACAATCAATACGCAT. Обратный праймер и зонд не имели в последовательности видоспецифических участков (табл. 2, 3).

Рецептор фага Gamma. Чувствительность к фагу γ (Gamma) является одним из методов дифференциации *B. anthracis* от других близкородственных микроорганизмов. Davison et al. установили, что рецептором для фага Gamma является белок VA3367, содержащий LPXTG-мотив, который с помощью сортазы A (SrtA) ковалентно связан с пептидными компонентами пептидогликанового слоя клеточной стенки [62]. Проведенное нами множественное выравнивание после-

довательностей гена, кодирующего белок ВА3367, и его гомологов выявило у всех штаммов *B. anthracis* трех нуклеотидную инсерцию ⁹⁷ААГ¹⁰¹. Благодаря этой особенности при трансляции *in silico* белок ВА3367 получает в своей последовательности дополнительный остаток глутаминовой кислоты в положении 33, рамка считывания сохраняется [58].

Данная инсерция является удобной ПЦР-мишенью. Нами был сконструирован прямой праймер, три 3'-концевые нуклеотида, которые комплементарны выявленной инсерции. Дополнительно для повышения специфичности была введена искусственная некомплементарная замена G→C в положении 4 с 3'-конца. Таким образом, этот праймер, даже гибридизируясь с ДНК неантрацидных бацилл, не сможет стать точкой начала элонгации для Taq-полимеразы из-за некомплементарности сразу четырех 3'-концевых нуклеотидов [61]. Обратный праймер и зонд были комплементарны региону, не имеющему видоспецифических отличий, специфичность ПЦР-реакции при этом должна достигаться только за счет одного праймера.

Проверка специфичности разработанных олигонуклеотидов

Специфичность сконструированных олигонуклеотидов проверялась двухэтапно. На первом этапе на тестовой панели штаммов (табл. 1) проверялись только праймеры к каждому локусу, попарно, в индивидуальных реакциях с учетом результатов ПЦР по кривой флуоресценции с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green и последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции. По результатам этого этапа испытаний: 1) праймеры к Ва5357 абсолютно специфичны, ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР не было зарегистрировано; 2) праймеры к *plcR* срабатывают положительно на всех исследованных штаммах *B. anthracis*. Из близкородственных бацилл ПЦР-положительным оказался единственный штамм *B. cereus* 164; 3) праймеры к ВА3367 (рецептор фага Gamma) срабатывают положительно на ДНК всех исследованных штаммах *B. anthracis*, но также и на ДНК трех штаммов *B. thuringiensis*. Таким образом, из 150 тест-штаммов для 4 мы получили ложный результат определения видовой принадлежности, при этом ложноположительный результат наблюдался для каждого такого штамма по результатам лишь одной реакции из трех.

На следующем этапе проверка специфичности проводилась в мультиплексной реакции, когда реакционная смесь содержала праймеры и зонды ко всем трем локусам (табл. 3). Четвертый канал (Cy5) остался неиспользованным, в дальнейшем его можно использовать для детекции результатов амплификации внутреннего контрольного образца.

Все штаммы *B. anthracis* были ПЦР-положительными по всем трем использованным каналам. Количество ложноположительных ответов с ДНК неантрацидных бацилл уменьшилось.

Так, не регистрировались положительные сигналы по каналу FAM, по которому считывался результат амплификации с праймерами и зондами к локусу ВА3367 (рецептор фага Gamma) в реакциях с ДНК *B. thuringiensis*. В то же время мы регистрировали положительный сигнал по каналу HEX (ви-

доспецифическая мутация в гене *plcR*) в реакции с ДНК *B. cereus* 164. По всей видимости, в случае с праймерами к ВА3367 мы имеем дело с неполной комплементарностью 3'-концевого региона праймера матрице ДНК *B. thuringiensis*, которая, даже снижая эффективность индивидуальной ПЦР, не приводит к полной остановке реакции. В условиях мультиплексной ПЦР повышение концентрации олигонуклеотидов (в нашем случае в 3,75 раза) при сохранении концентраций других компонентов реакционной смеси приводит к изменению параметров гибридизации олигонуклеотидов с матричной ДНК и между собой, а также к возникновению конкуренции индивидуальных ПЦР за связывание димеров праймер-матричной ДНК с полимеразой и за доступные dNTP. Эти факторы в совокупности могут снижать эффективность каждой из индивидуальных реакций в мультиплексе и, в результате, приводить к полному ингибированию реакции при неполной комплементарности праймера и матрицы, в нашем случае – видоспецифического праймера к рецептору фага Gamma и ДНК *B. thuringiensis*. Что касается сохранения положительного результата в реакции с праймерами к *plcR* и ДНК *B. cereus* 164 даже в условиях мультиплексной реакции, то это, скорее всего, говорит о наличии у штамма 164 мутации в данном гене, идентичной мутации у *B. anthracis*. Учитывая указанную выше генетическую мноморфность группы видов *B. cereus sensu lato* и распространенность горизонтального генетического переноса в рамках этой группы, этот факт не выглядит невозможным. Более того, положительный результат ПЦР с использованием праймеров к генетической мишени, которая считается высокоспецифичной для *B. anthracis* [20], только подчеркивает важность использования в генодиагностике сибиреязвенного микроба более чем одного локуса-мишени, будь то в индивидуальных или же в мультиплексных ПЦР.

Не получив на исследуемой выборке из 150 штаммов (табл. 1) ложноотрицательных результатов и получив ложноположительный результат лишь для одного штамма по одному из трех оптических каналов, мы можем сделать вывод, что положительный результат, фиксируемый в предлагаемой нами мультиплексной ПЦР по всем трем оптическим каналам, говорит о принадлежности исследуемого штамма к *B. anthracis*, а положительный результат по одному каналу говорит о принадлежности штамма к неантрацидным бациллам. В то же время мы не можем четко регламентировать интерпретацию результатов в гипотетических спорных случаях, таких как положительный результат по двум каналам из трех. Но, пусть даже несколько спекулятивно экстраполируя наши результаты, мы можем утверждать, что исследуемый штамм в такой ситуации можно если и не отнести безоговорочно к *B. anthracis*, то счесть атипичным штаммом группы видов *B. cereus sensu lato*, который требует более полного изучения с использованием широкого спектра генетических и фенотипических методов определения его видовой принадлежности и эпидемической опасности.

Заключение

Таким образом, нами был разработан набор олигонуклеотидов, являющийся прототипом мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба от

близкородственных бацилл. Использование в качестве ПЦР-мишеней только хромосомных маркеров позволяет достоверно идентифицировать бесплазмидные изоляты *B. anthracis*, что достаточно важно при анализе штаммов, выделяемых из старых почвенных очагов, либо штаммов, утерявших плазмиды в процессе культивирования и множественных пересевов на питательных средах в лабораторных условиях, а также нетипичных штаммов *B. anthracis*, обладающих РХО-подобными плазмидами. Использование сразу трех ПЦР-мишеней, две из которых на данный момент признаны наиболее видоспецифичными для *B. anthracis*, позволяет снизить риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов до минимума даже в гипотетическом случае определения видовой принадлежности атипичных штаммов *B. cereus sensu lato*. Несмотря на некоторую избыточность предлагаемого нами набора олигонуклеотидов для нужд клинической диагностики и невозможность определения с его помощью плазмидного профиля штамма, важного для медицины и ветеринарии, он может оказаться небесполезным для лабораторий, занимающихся коллекционной деятельностью и изучающих экологию и эпидемиологию патогенных бацилл, в том числе и *B. anthracis*, в полевых условиях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral 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

- Turnbull PC. World Health Organization. Anthrax in humans and animals. In: (Editor) PT, editor. Geneva (CH): WHO Press; 2008.
- Ardi P, Emanuele C, Luigina S, Leonardo M, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains circulating in Albania. Journal of Bioterrorism & Biodefense. 2015;7:1-6.
- Okello A, Welburn S, Smith J. Crossing institutional boundaries: mapping the policy process for improved control of endemic and neglected zoonoses in sub-Saharan Africa. Health Policy Plan. 2015 Jul;30(6):804-12. DOI: 10.1093/heapol/czu059
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АН, и др. Эпидемиологические особенности вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. 2017, с. 81-84.
- Gierczyński R, Zasada AA, Raddadi N, Merabishvili M, Daffonchio D, Rastawicki W, Jagielski M. Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. FEMS Microbiol Lett. 2007 Jul;272(1):55-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00741.x
- Gobeli Brawand S, Kittl S, Dettwiler M, Thomann A, Feyer S, Cachim J, et al. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. BMC Vet Res. 2019 Jul 29;15(1):265. DOI: 10.1186/s12917-019-1996-4
- Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. Genome Res. 2012 Aug;22(8):1512-24. DOI: 10.1101/gr.134437.111
- Cardazzo B, Negrisola E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. Appl Environ Microbiol. 2008 Feb;74(3):850-60. DOI: 10.1128/AEM.01495-07
- Turnbull PC, Hutson MJ, Ward, Jones MN et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. J Appl Bacteriol. 1992;72:21-28. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
- Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. BMC Genomics. 2002 Dec 9;3(1):34. DOI: 10.1186/1471-2164-3-34
- Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. J Bacteriol. 2002 Jan;184(1):134-41. DOI: 10.1128/jb.184.1.134-141.2002
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
- Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. PLoS One. 2010 Jul 9;5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986
- Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, Holland G, Leendertz FH, Pauli G, Grunow R, Nattermann H. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. J Bacteriol. 2006 Aug;188(15):5333-44. DOI: 10.1128/JB.00303-06
- Carlson CJ, Getz WM, Kausrud KL, Cizauskas CA, Blackburn JK, Bustos Carrillo FA, et al. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). Biol Rev Camb Philos Soc. 2018 Nov;93(4):1813-1831. DOI: 10.1111/brv.12420
- Braun P, Grass G, Aceti A, Serrecchia L, Affuso A, Marino L, et al. Microevolution of Anthrax from a Young Ancestor (M.A.Y.A.) Suggests a Soil-Borne Life Cycle of *Bacillus anthracis*. PLoS One. 2015 Aug 12;10(8):e0135346. DOI: 10.1371/journal.pone.0135346
- Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. J Bacteriol. 1996 Jan;178(2):377-84. DOI: 10.1128/jb.178.2.377-384.1996
- Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM, Green G, Hill KK, Kuske CR, et al. PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 3;95(3):1224-9. DOI: 10.1073/pnas.95.3.1224
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000
- Cherif A, Borin S, Rizzi A, Ouzari H, Boudabous A, Daffonchio D. Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. J Appl Microbiol. 2002;93(3):456-62. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01712.x
- Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, Cherif A, Carmagnola L, Brusetti L, Rizzi A, Chanishvili N, Visca P, Sharp R, Borin S. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. Appl Environ Microbiol. 2006 Feb;72(2):1295-301. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1295-1301.2006
- Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DelVecchio VG. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Appl Environ Microbiol. 2001 Aug;67(8):3720-7. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3720-3727.2001
- Radnedge L, Agron PG, Hill KK, Jackson PJ, Ticknor LO, Keim P, Andersen GL. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and

- Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 2003 May;69(5):2755-64. DOI: 10.1128/aem.69.5.2755-2764.2003
24. Bode E, Hurtle W, Norwood D. Real-time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5825-31. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5825-5831.2004
 25. Coker PR, Smith KL, Fellows PF, Rybachuck G, Kousoulas KG, Hugh-Jones ME. *Bacillus anthracis* virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1212-8. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1212-1218.2003
 26. Cheun HI, Makino SI, Watarai M, Shirahata T, Uchida I, Takeshi K. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. J Appl Microbiol. 2001 Sep;91(3):421-6. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01395.x
 27. Luna VA, King D, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, Amuso P, Cattani J. Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1252-5. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1252-1255.2003
 28. Vahedi F, Moazeni Julia G, Kianizadeh M, Mahmoudi M. Characterization of *Bacillus anthracis* spores isolates from soil by biochemical and multiplex PCR analysis. East Mediterr Health J. 2009 Jan-Feb;15(1):149-56.
 29. Wang SH, Wen JK, Zhou YF, Zhang ZP, Yang RF, Zhang JB, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR on DNA chip. Biosens Bioelectron. 2004 Nov 1;20(4):807-13. DOI: 10.1016/j.bios.2004.03.019
 30. Olsen JS, Skogan G, Fykse EM, Rawlinson EL, Tomaso H, Granum PE, Blatny JM. Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. J Microbiol Methods. 2007 Dec;71(3):265-74. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.10.001
 31. Leski TA, Caswell CC, Pawlowski M, Klinke DJ, Bujnicki JM, Hart SJ, Lukomski S. Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. Appl Environ Microbiol. 2009 Nov;75(22):7163-72. DOI: 10.1128/AEM.01069-09
 32. Ryu C, Lee K, Yoo C, Seong WK, Oh HB. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. Microbiol Immunol. 2003;47(10):693-9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03434.x
 33. Hoffmaster AR, Meyer RF, Bowen MD, Marston CK, Weyant RS, Thurman K, et al. Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. Emerg Infect Dis. 2002 Oct;8(10):1178-82. DOI: 10.3201/eid0810.020393
 34. Marston CK, Gee JE, Popovic T, Hoffmaster AR. Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus species* isolates. BMC Microbiol. 2006 Mar 3;6:22. DOI: 10.1186/1471-2180-6-22
 35. Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC Microbiol. 2010 Dec 8;10:314. DOI: 10.1186/1471-2180-10-314
 36. Kim K, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, et al. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Feb 1;43(2):301-10. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.005
 37. Бургасов ПН, Рожков ГИ. Сибиреязвенная инфекция. М., 1984, 208 с.
 38. Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al; Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. JAMA. 2002 May 1;287(17):2236-52. DOI: 10.1001/jama.287.17.2236
 39. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. Mol Cell Probes. 2008 Oct-Dec;22(5-6):313-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2008.06.001
 40. Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, et al. Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep;77(18):6570-8. DOI: 10.1128/AEM.00623-11
 41. Wielinga PR, Hamidjaja RA, Agren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, et al. A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. Int J Food Microbiol. 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S137-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039
 42. Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, Pozzi G. Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):3956-63. DOI: 10.1128/jcm.40.11.3956-3963.2002
 43. Ellerbrok H, Nattermann H, Ozel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett. 2002 Aug 27;214(1):51-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11324.x
 44. Ko KS, Kim JM, Kim JW, Jung BY, Kim W, Kim IJ, Kook YH. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):2908-14. DOI: 10.1128/jcm.41.7.2908-2914.2003
 45. Drago L, Lombardi A, Vecchi ED, Gismondo MR. Real-time PCR assay for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in clinical samples. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):4399. DOI: 10.1128/jcm.40.11.4399.2002
 46. Satterfield BC, Kulesh DA, Norwood DA, Wasielewski LP Jr, Caplan MR, West JA. Tentacle Probes: differentiation of difficult single-nucleotide polymorphisms and deletions by presence or absence of a signal in real-time PCR. Clin Chem. 2007 Dec;53(12):2042-50. DOI: 10.1373/clinchem.2007.091488
 47. Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, Kaplan RS, Garrison J, Bridge D, et al. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):179-85. DOI: 10.1128/jcm.42.1.179-185.2004
 48. Derzelle S, Mendy C, Laroche S, Madani N. Use of high-resolution melting and melting temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. J Microbiol Methods. 2011 Nov;87(2):195-201. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.08.005
 49. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1483-90. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1483-1490.1999
 50. Park SH, Oh HB, Seong WK, Kim CW, Cho SY, Yoo CK. Differential analysis of *Bacillus anthracis* after pX01 plasmid curing and comprehensive data on *Bacillus anthracis* infection in macrophages and glial cells. Proteomics. 2007 Oct;7(20):3743-58. DOI: 10.1002/pmic.200700338
 51. Easterday WR, Van Ert MN, Simonson TS, Wagner DM, Kenefic LJ, Allender CJ, Keim P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1995-7. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1995-1997.2005
 52. Easterday WR, Van Ert MN, Zanecki S, Keim P. Specific detection of *Bacillus anthracis* using a TaqMan mismatch amplification mutation assay. Biotechniques. 2005 May;38(5):731-5. DOI: 10.2144/05385ST03
 53. Ireng LM, Durant JF, Tomaso H, Pilo P, Olsen JS, Ramisse V, Mahillon J, Gala JL. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Nov;88(5):1179-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2848-0
 54. Nübel U, Schmidt PM, Reiss E, Bier F, Beyer W, Naumann D. Oligonucleotide microarray for identification of *Bacillus anthracis* based on intergenic transcribed spacers in ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 15;240(2):215-23. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.09.042
 55. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Hezka J, Beyer W, Hadfield TL, Kostrikis LG. Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus isolates*. J Microbiol Methods. 2009 Jul;78(1):45-53. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.04.005

56. Ågren J, Hamidjaja RA, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, Vigre H, et al. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence*. 2013 Nov 15;4(8):671-85. DOI: 10.4161/viru.26288
57. Lewerin SS, Elvander M, Westermark T, Hartzell LN, Norström AK, Ehns S, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand*. 2010 Feb 1;52(1):7. DOI: 10.1186/1751-0147-52-7
58. Тимофеев ВС, Каптелова ВВ, Бахтеева ИВ, Миронова РИ, Титарева ГМ, Гончарова ЮО, и др. Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов. *Бактериология*. 2018;3(3):22-27. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27
59. Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, Fouet A. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 2001 Dec;42(5):1189-98. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02692.x
60. Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*. 1999 Jun;32(5):1043-53. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x
61. Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866
62. Davison S, Couture-Tosi E, Candela T, Mock M, Fouet A. Identification of the *Bacillus anthracis* (gamma) phage receptor. *J Bacteriol*. 2005 Oct;187(19):6742-9. DOI: 10.1128/JB.187.19.6742-6749.2005

References

1. Turnbull PC. World Health Organization. Anthrax in humans and animals. In: (Editor) PT, editor. Geneva (CH): WHO Press; 2008.
2. Ardi P, Emanuele C, Luigina S, Leonardo M, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains circulating in Albania. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*. 2015;7:1-6.
3. Okello A, Welburn S, Smith J. Crossing institutional boundaries: mapping the policy process for improved control of endemic and neglected zoonoses in sub-Saharan Africa. *Health Policy Plan*. 2015 Jul;30(6):804-12. DOI: 10.1093/heapol/czu059
4. Popova AYu, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AN, et al. Epidemiological features of the anthrax outbreak in the Yamalo-Nenets Autonomous district in 2016. *Current problems of diseases*. 2017, pp. 81-84. (In Russian).
5. Gierczyński R, Zasada AA, Raddadi N, Merabishvili M, Daffonchio D, Rastawicki W, Jagielski M. Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Jul;272(1):55-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00741.x
6. Gobeli Brawand S, Kittl S, Dettwiler M, Thomann A, Feyer S, Cachim J, et al. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. *BMC Vet Res*. 2019 Jul 29;15(1):265. DOI: 10.1186/s12917-019-1996-4
7. Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res*. 2012 Aug;22(8):1512-24. DOI: 10.1101/gr.134437.111
8. Cardazzo B, Negrisolo E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb;74(3):850-60. DOI: 10.1128/AEM.01495-07
9. Turnbull PC, Hutson MJ, Ward, Jones MN et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol*. 1992;72:21-28. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
10. Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*. 2002 Dec 9;3(1):34. DOI: 10.1186/1471-2164-3-34
11. Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol*. 2002 Jan;184(1):134-41. DOI: 10.1128/jb.184.1.134-141.2002
12. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
13. Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010 Jul 9;5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986
14. Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, Holland G, Leendertz FH, Pauli G, Grunow R, Nattermann H. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol*. 2006 Aug;188(15):5333-44. DOI: 10.1128/JB.00303-06
15. Carlson CJ, Getz WM, Kausrud KL, Cizauskas CA, Blackburn JK, Bustos Carrillo FA, et al. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018 Nov;93(4):1813-1831. DOI: 10.1111/brv.12420
16. Braun P, Grass G, Aceti A, Serrecchia L, Affuso A, Marino L, et al. Microevolution of Anthrax from a Young Ancestor (M.A.Y.A.) Suggests a Soil-Borne Life Cycle of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0135346. DOI: 10.1371/journal.pone.0135346
17. Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol*. 1996 Jan;178(2):377-84. DOI: 10.1128/jb.178.2.377-384.1996
18. Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM, Green G, Hill KK, Kuske CR, et al. PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):1224-9. DOI: 10.1073/pnas.95.3.1224
19. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000
20. Cherif A, Borin S, Rizzi A, Ouzari H, Boudabous A, Daffonchio D. Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *J Appl Microbiol*. 2002;93(3):456-62. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01712.x
21. Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, Cherif A, Carmagnola L, Brusetti L, Rizzi A, Chanishvili N, Visca P, Sharp R, Borin S. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Feb;72(2):1295-301. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1295-1301.2006
22. Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DelVecchio VG. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Aug;67(8):3720-7. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3720-3727.2001
23. Radnedge L, Agron PG, Hill KK, Jackson PJ, Ticknor LO, Keim P, Andersen GL. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 May;69(5):2755-64. DOI: 10.1128/aem.69.5.2755-2764.2003
24. Bode E, Hurtle W, Norwood D. Real-time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5825-31. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5825-5831.2004

25. Coker PR, Smith KL, Fellows PF, Rybachuck G, Kousoulas KG, Hugh-Jones ME. *Bacillus anthracis* virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1212-8. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1212-1218.2003
26. Cheun HI, Makino SI, Watarai M, Shirahata T, Uchida I, Takeshi K. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. J Appl Microbiol. 2001 Sep;91(3):421-6. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01395.x
27. Luna VA, King D, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, Amuso P, Cattani J. Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1252-5. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1252-1255.2003
28. Vahedi F, Moazeni Jula G, Kianizadeh M, Mahmoudi M. Characterization of *Bacillus anthracis* spores isolates from soil by biochemical and multiplex PCR analysis. East Mediterr Health J. 2009 Jan-Feb;15(1):149-56.
29. Wang SH, Wen JK, Zhou YF, Zhang ZP, Yang RF, Zhang JB, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR on DNA chip. Biosens Bioelectron. 2004 Nov 1;20(4):807-13. DOI: 10.1016/j.bios.2004.03.019
30. Olsen JS, Skogan G, Fykse EM, Rawlinson EL, Tomaso H, Granum PE, Blatny JM. Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. J Microbiol Methods. 2007 Dec;71(3):265-74. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.10.001
31. Leski TA, Caswell CC, Pawlowski M, Klinke DJ, Bujnicki JM, Hart SJ, Lukomski S. Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. Appl Environ Microbiol. 2009 Nov;75(22):7163-72. DOI: 10.1128/AEM.01069-09
32. Ryu C, Lee K, Yoo C, Seong WK, Oh HB. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. Microbiol Immunol. 2003;47(10):693-9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03434.x
33. Hoffmaster AR, Meyer RF, Bowen MD, Marston CK, Weyant RS, Thurman K, et al. Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. Emerg Infect Dis. 2002 Oct;8(10):1178-82. DOI: 10.3201/eid0810.020393
34. Marston CK, Gee JE, Popovic T, Hoffmaster AR. Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus species* isolates. BMC Microbiol. 2006 Mar 3;6:22. DOI: 10.1186/1471-2180-6-22.
35. Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC Microbiol. 2010 Dec 8;10:314. DOI: 10.1186/1471-2180-10-314
36. Kim K, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, et al. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Feb 1;43(2):301-10. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.005
37. Burgasov PN, Rozhkov GI. Anthrax infection. Moscow, 1984, 208 p. (In Russian).
38. Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al; Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. JAMA. 2002 May 1;287(17):2236-52. DOI: 10.1001/jama.287.17.2236
39. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. Mol Cell Probes. 2008 Oct-Dec;22(5-6):313-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2008.06.001
40. Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, et al. Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep;77(18):6570-8. DOI: 10.1128/AEM.00623-11
41. Wielinga PR, Hamidjaja RA, Agren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, et al. A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. Int J Food Microbiol. 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S137-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039
42. Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, Pozzi G. Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):3956-63. DOI: 10.1128/jcm.40.11.3956-3963.2002
43. Ellerbrok H, Nattermann H, Ozel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett. 2002 Aug 27;214(1):51-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11324.x
44. Ko KS, Kim JM, Kim JW, Jung BY, Kim W, Kim IJ, Kook YH. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):2908-14. DOI: 10.1128/jcm.41.7.2908-2914.2003
45. Drago L, Lombardi A, Vecchi ED, Gismondo MR. Real-time PCR assay for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in clinical samples. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):4399. DOI: 10.1128/jcm.40.11.4399.2002
46. Satterfield BC, Kulesh DA, Norwood DA, Wasieloski LP Jr, Caplan MR, West JA. Tentacle Probes: differentiation of difficult single-nucleotide polymorphisms and deletions by presence or absence of a signal in real-time PCR. Clin Chem. 2007 Dec;53(12):2042-50. DOI: 10.1373/clinchem.2007.091488
47. Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, Kaplan RS, Garrison J, Bridge D, et al. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):179-85. DOI: 10.1128/jcm.42.1.179-185.2004
48. Derzelle S, Mendy C, Laroche S, Madani N. Use of high-resolution melting and melting temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. J Microbiol Methods. 2011 Nov;87(2):195-201. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.08.005
49. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1483-90. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1483-1490.1999
50. Park SH, Oh HB, Seong WK, Kim CW, Cho SY, Yoo CK. Differential analysis of *Bacillus anthracis* after pX01 plasmid curing and comprehensive data on *Bacillus anthracis* infection in macrophages and glial cells. Proteomics. 2007 Oct;7(20):3743-58. DOI: 10.1002/pmic.200700338
51. Easterday WR, Van Ert MN, Simonson TS, Wagner DM, Kenefic LJ, Allender CJ, Keim P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1995-7. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1995-1997.2005
52. Easterday WR, Van Ert MN, Zanecki S, Keim P. Specific detection of *Bacillus anthracis* using a TaqMan mismatch amplification mutation assay. Biotechniques. 2005 May;38(5):731-5. DOI: 10.2144/05385ST03
53. Ireng LM, Durant JF, Tomaso H, Pilo P, Olsen JS, Ramisse V, Mahillon J, Gala JL. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Nov;88(5):1179-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2848-0
54. Nübel U, Schmidt PM, Reiss E, Bier F, Beyer W, Naumann D. Oligonucleotide microarray for identification of *Bacillus anthracis* based on intergenic transcribed spacers in ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 15;240(2):215-23. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.09.042
55. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Hezka J, Beyer W, Hadfield TL, Kostrikis LG. Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates. J Microbiol Methods. 2009 Jul;78(1):45-53. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.04.005
56. Ågren J, Hamidjaja RA, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, Vigre H, et al. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. Virulence. 2013 Nov 15;4(8):671-85. DOI: 10.4161/viru.26288
57. Lewerin SS, Elvander M, Westermark T, Hartzell LN, Norström AK, Ehns S, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd--1st case in 27 years: Case report. Acta Vet Scand. 2010 Feb 1;52(1):7. DOI: 10.1186/1751-0147-52-7

58. Timofeev VS, Kaptelova VV, Bakhteeva IV, Mironova RI, Titareva GM, Goncharova YuO, et al. Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker to differentiate *B. anthracis* from closely related species. *Bacteriology*. 2018;3(3):22-27. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27
59. Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, Fouet A. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 2001 Dec;42(5):1189-98. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02692.x
60. Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*. 1999 Jun;32(5):1043-53. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x
61. Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866
62. Davison S, Couture-Tosi E, Candela T, Mock M, Fouet A. Identification of the *Bacillus anthracis* (gamma) phage receptor. *J Bacteriol*. 2005 Oct;187(19):6742-9. DOI: 10.1128/JB.187.19.6742-6749.2005

Информация об авторах:

Каптелова Валерия Владимировна, младший научный сотрудник
ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495) 974-9646
E-mail: lero4ka-92@inbox.ru

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

Кравченко Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: tbkrav@mail.ru

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

Хлопова Ксения Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: xlopova.12@yandex.ru

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы
отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: timofeev@obolensk.org

Information about authors:

Valeria V. Kaptelova, junior researcher, Central Research Institute of Epidemiology
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation
Phone: (495) 974-9646
E-mail: lero4ka-92@inbox.ru

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

Tatiana B. Kravchenko, PhD (Biology), leading researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: tbkrav@mail.ru

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

Ksenia V. Khlopova, junior researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: xlopova.12@yandex.ru

Vitaliy S. Timofeev, PhD (Biology), leading researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: timofeev@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии и человеческая ДНК на рисунках Леонардо да Винчи

Команда ученых из Австрии и Италии посредством геномного подхода Naporoge обнаружила, что на работах художника преобладают сообщества бактерий *Gamma*proteobacteria отряда Pseudomonadales. По-видимому, часть микроорганизмов была занесена реставраторами, а часть – очень давно мухами. Обнаружено также большое количество человеческой ДНК.

Обнаруженные микроорганизмы не связаны с их географическим происхождением (Корсинская библиотека Рима).

Полагают, что новый подход будет перспективен для создания аналога отпечатка пальца для каждого рисунка.

Piñar G. et al. *The Microbiome of Leonardo da Vinci's Drawings: A Bio-Archive of Their History.*
Front Microbiol. 2020;11:593401.



Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов чумного микроба, циркулирующих в песчаночьих природных очагах чумы Республики Казахстан

З.Ж.Абдел, Т.В.Мека-Меченко, А.А.Абдирасилова, Р.С.Мусагалиева, Ж.С.Далибаев, Э.Ж.Бегимбаева, И.Б.Утепова, А.М.Матжанова, Д.Т.Есимсеит, Б.З.Абделиев, А.К.Рысбекова, А.К.Касенова, А.К.Умарова

Республиканское государственное предприятие на правах хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан

Начиная с 2010 г. в 8 из 14 автономных очагов Центральноазиатского очага чумы Казахстана установлено активное течение эпизоотии с выделением возбудителя чумы от носителей и переносчиков. В процессе проведения паспортизации ландшафтно-эпизоотологического районирования природных очагов чумы Казахстана необходимо было учитывать параметры изменчивости главного компонента паразитарной системы – чумного микроба.

Цель исследования. Изучение фенотипических и генетических свойств штаммов чумного микроба, выделенных в природных песчаночьих очагах чумы Казахстана.

Материалы и методы. В работе использованы 1196 штаммов *Yersinia pestis*, изолированные за последние 10 лет (2010–2019 гг.) из природных песчаночьих очагов чумы, паспорта штаммов, литературные источники, данные по паспортизации очагов чумы Казахстана. Изучение штаммов проводилось бактериологическими, серологическими и молекулярно-генетическими методами.

Результаты. Проведены паспортизация и типизация территорий песчаночьих очагов чумы с учетом фенотипических и молекулярно-генетических свойств штаммов *Y. pestis*, выделенных из 12 автономных очагов Центральноазиатского очага чумы Казахстана в 2010–2019 гг. По результатам изучения были выявлены 84 атипичных штамма. В результате анализа среди исследованных штаммов выявлено 18 генотипов, из них 13 (72,2%) уникальных. Остальные 5 генотипов сформировали 5 кластеров, объединяющих 20 штаммов (60,6%), и все штаммы филогенетически отнесены к предшественникам биовара *Mediaevalis*.

Ключевые слова: чумной микроб, очаги чумы, фенотипические свойства, молекулярно-генетические свойства

Для цитирования: Абдел З.Ж., Мека-Меченко Т.В., Абдирасилова А.А., Мусагалиева Р.С., Далибаев Ж.С., Бегимбаева Э.Ж., Утепова И.Б., Матжанова А.М., Есимсеит Д.Т., Абделиев Б.З., Рысбекова А.К., Касенова А.К., Умарова А.К. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов чумного микроба, циркулирующих в песчаночьих природных очагах чумы Республики Казахстан. Бактериология. 2020; 5(3): 25–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-25-33

Biological properties and molecular and genetic characteristics of plague microbe strains circulating in sandy natural plague foci of the Republic of Kazakhstan

Z.Zh.Abdel, T.V.Meka-Mechenko, A.A.Abdirasilova, R.S.Musagaliyeva, Zh.S.Dalibayev, E.Zh.Begimbayeva, I.B.Uteпова, A.M.Matshanova, D.T.Yessimseit, B.Z.Abdeliyev, A.K.Rysbekova, A.K.Kasenova, S.K.Umarova

M.Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan

Для корреспонденции:

Далибаев Жандос Сатыбалдыевич, и.о. начальника отдела экспресс-диагностики и индикации особо опасных инфекций Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан

Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жакхангер, 14

Телефон: (727) 223-3821

E-mail: zhan.dalibaev@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6567-2225>

Статья поступила 07.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

For correspondence:

Zhandos S. Dalibayev, acting head of the department of express-diagnostics and indication of particularly dangerous infections, M.Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan

Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan

Phone: (727) 223-3821

E-mail: zhan.dalibaev@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6567-2225>

The article was received 07.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

Since 2010, an active course of epizootics with the release of the plague pathogen, isolated from hosts and vectors has been established in 8 autonomous foci of the plague from 14 autonomous foci of the Central Asian plague focus in Kazakhstan. It was necessary to take into account the parameters of variability of the main component of the parasitic system – the plague microbe in the process of certification of landscape and epizootological zoning of natural foci of plague in Kazakhstan.

The aim of the work was to study the phenotypic and genetic properties of strains of the plague microbe isolated in natural sandy plague foci of Kazakhstan.

Materials and methods. The work used 1196 strains of *Yersinia pestis* isolated over the past 10 years (2010–2019) from natural sandy plague foci, strain passports, literature sources, data on certification of plague foci in Kazakhstan. The study of the strains was carried out by bacteriological, serological and molecular genetic methods.

Results. Certification and typification of the territories of sandy plague foci were carried out, taking into account the phenotypic and molecular-genetic properties of *Y. pestis* strains isolated from 12 autonomous foci of the Central Asian plague focus of Kazakhstan in 2010–2019. According to the results of the study, 84 atypical strains were identified. As a result of the analysis, 18 genotypes were identified among the studied strains, of which 13 (72.2%) were unique and did not repeat in the sample. The remaining 5 genotypes formed 5 clusters, combining 20 strains (60.6%) and all strains were phylogenetically assigned to representatives of the *Mediaevalis* biovar.

Key words: *plague microbe, plague foci, phenotypic features, molecular genetic features*

For citation: Abdel Z.Zh., Meka-Mechenko T.V., Abdirasilova A.A., Musagaliev R.S., Dalibayev Zh.S., Begimbayeva E.Zh., Utepova I.B., Matzhanova A.M., Yessimseit D.T., Abdeliyev B.Z., Rysbekova A.K., Kasenova A.K., Umarova S.K. Biological properties and molecular and genetic characteristics of plague microbe strains circulating in sandy natural plague foci of the Republic of Kazakhstan. *Bacteriology*. 2020; 5(3): 25–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-25-33

При выборе критериев типизации территорий природных очагов и при проведении паспортизации ландшафтно-эпизоотологического районирования природных очагов чумы Казахстана нами были использованы данные об особенностях видового спектра носителей и переносчиков, а также учитывались параметры изменчивости главного компонента паразитарной системы – чумного микроба (*Yersinia pestis*).

Существование природных очагов чумы обуславливает необходимость систематического контроля за степенью их активности и характером эпизоотического проявления, с учетом изучения экологии, генотипической и фенотипической изменчивости *Y. pestis* [1–3]. Без этих данных невозможно осуществление эффективного эпидемиологического надзора и предупреждение заболеваемости людей чумой.

Начиная с 2010 г. в 8 из 14 автономных очагов Центрально-азиатского очага чумы Казахстана установлено активное течение эпизоотии с выделением возбудителя чумы от носителей и переносчиков: Приаральско-Каракумском, Северо-Приаральском, Таукумском, Мойынкумском, Прибалхашском, Илийском межгорном, Бетпақдалинском и Предустюртском.

Лабораториями противочумных станций Республики Казахстан в 2010–2019 гг. на энзоотичной территории было выделено всего 1578 штаммов чумного микроба. Важно отметить, что 63% культур изолированы от переносчиков, что увеличивало риск заражения людей в природных очагах этой инфекции.

В настоящее время нашим научным центром для типирования *Y. pestis* применяются как фенотипические, так и генетические методы [4, 5]. В основу фенотипических методов положены питательные потребности, способность ферментировать различные субстраты и вирулентность для различных видов животных [6, 7].

В настоящее время широко применяется генетическое типирование штаммов *Y. pestis* с помощью различных методов [8–12]. С помощью методов молекулярного типирования можно получить специфические характеристики отдельных штаммов микроорганизмов, которые при расследовании вспышек инфекционных заболеваний позволяют установить различия между клонально родственными (эпидемическими) и не родственными (спорадическими) штаммами, реконстру-

ировать пути распространения инфекции, определить ее источник [7].

К настоящему времени накопился значительный научный материал по основным носителям (большая песчанка), переносчикам и биологическим свойствам штаммов из различных очагов чумы Казахстана, что используется при паспортизации очагов [13–16].

Сложившаяся обстановка диктует необходимость изучения современного состояния природных очагов чумы, включая фенотипические и молекулярно-генетические свойства циркулирующих штаммов, для проведения паспортизации и типизации территорий песчаночьих природных автономных очагов Центральноазиатского очага чумы Казахстана.

Цель исследования – изучение фенотипических и генетических свойств штаммов чумного микроба, выделенных в природных песчаночьих очагах чумы Казахстана.

Материалы и методы

Для проведения работ использованы 1196 штаммов *Y. pestis*, изолированных за последние 10 лет (2010–2019 гг.) из природных песчаночьих очагов чумы, паспорта штаммов, литературные источники, данные по паспортизации очагов чумы Казахстана. Изучение штаммов проводилось бактериологическими и серологическими методами согласно методическому руководству [6]. При изучении штаммов чумного микроба в качестве контрольных использовались депонированные в музее живых культур Национального научного центра особо опасных инфекций (ННЦООИ) им. Масгута Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан 18 референтных штаммов *Y. pestis* из различных автономных очагов Казахстана, один вакцинный штамм EV (*Y. pestis* EV) и один штамм псевдотуберкулезного микроба (*Y. pseudotuberculosis*). Видовая и типовая принадлежность были подтверждены молекулярно-генетическими методами исследования, которые проводились классическим методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест-систем «Генпест» (Россия) и тест-систем Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева; а также методом ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов Idaho Technology

(Target 1 и 2) на приборе Roche 2.0. LightCycler®, исследованы ДНК 33 штамма.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения фенотипических свойств. За последние 10 лет (2010–2019 гг.) нами были изучены фенотипические свойства 1196 штаммов *Y. pestis*, выделенных из 12 автономных песчаночьих очагов Центральноазиатского пустынного очага чумы Казахстана: Северо-Приаральского, Бетпақдалинского, Прибалхашского, Илийского межгорного, Таукумского, Мойынкумского, Устюртского, Предустюртского, Приаральско-Каракумского, Мангышлакского, Арысум-Дарьялыктақырского и Кызылкумского.

Для дифференциации по активности автономные очаги были разделены на две основные группы по следующим критериям: 1-я группа – автономные очаги чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений, 2-я группа – автономные очаги с высокой эпизоотической активностью и редкими проявлениями (или отсутствием) эпидемических осложнений (табл. 1).

Таким образом, по фенотипическим свойствам было изучено всего 1196 культур чумы, из них: типичные – 1132 штамма (94,6%), нетипичные – 64 штамма (5,7%). Из них из автономных очагов чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений типичных – 669 (92,4%), нетипичных – 55 (7,6%). Среди общего числа штаммов процент нетипичных составил 4,6%. Результаты изучения штаммов из очагов с редкими проявлениями (или отсутствием) эпидемических осложнений типичных было 463 (98,0%) и нетипичных – 9 (1,9%); 0,7% от общего числа всех выделенных штаммов.

Из этого следует, что большинство изученных штаммов по морфологическим и тинкториальным свойствам были

типичными для Центральноазиатского пустынного очага чумы: обладали одинаковыми биологическими свойствами вне зависимости от места, сезона и источника выделения. Штаммы ферментировали глицерин через 48 ч; ферментировали до кислоты без газа арабинозу, глюкозу, маннозу, мальтозу, маннит; не разлагали рамнозу, мальтозу, сахарозу, сорбит; не образовывали нитриты; не обладали уреазной активностью; лизировались бактериофагами: псевдотуберкулезным, чумным Покровским (П) и Л-413.

По результатам изучения фенотипических и молекулярно-генетических свойств 1196 штаммов *Y. pestis* были выявлены 84 атипичных штамма: по фенотипическим свойствам – 64 (5,3%), молекулярно-генетическим – 20 (1,7%).

Анализ результатов показал, что в автономных очагах чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений в 8,3 раза больше нетипичных штаммов по фенотипическим и молекулярно-генетическим свойствам. Большинство нетипичных штаммов (75 шт.) были выделены из автономных очагов чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений, что составило 89,2% от общего числа атипичных штаммов. Появление штаммов с измененными фенотипическими и генотипическими свойствами в течение длительной эпизоотии чумы может вызывать затяжные формы инфекционного процесса.

Были изучены детерминанты вирулентности штаммов. Антиген F1 обнаружен у 1173 из 1196 штаммов в количестве от 1250 до 78125 м.к./мл. Фракция 1 не обнаружена у 22 штаммов из Прибалхашского и 1 штамма из Мойынкумского автономных очагов чумы.

По мнению Portnoy, Martinez [17], продукция фракции 1 *Y. pestis* определяется функцией двух локусов, отвечающих за синтез и накопление антигена на поверхности клетки.

Таблица 1. Результаты изучения штаммов *Y. pestis*, выделенных из автономных очагов чумы Казахстана в 2010–2019 гг.

Наименование автономного очага чумы	Всего изучено штаммов	Из них выявлено по фенотипическим свойствам		Из них выявлено по молекулярно-генетическим свойствам	
		типичные	нетипичн.	типичные	нетипичн.
1-я группа*					
Илийский межгорный	190	183	7	190	–
Мангышлакский	3	3	–	3	–
Предустюртский	20	20	–	20	–
Приаральско-Каракумский	89	88	1	89	–
Прибалхашский	322	276	46	302	20
Северо-Приаральский	20	19	1	20	–
Устюртский	80	80	–	80	–
Всего по 1-й группе	724	669	55	704	20
2-я группа*					
Арысум-Дарьялыктақырский	21	21	–	21	–
Бетпақдалинский	60	60	–	60	–
Кызылкумский	49	49	–	49	–
Мойынкумский	234	228	6	234	–
Таукумский	108	105	3	108	–
Всего по 2-й группе	472	463	9	472	–
Итого	1196	1132	64	1176	20

Наименование автономного очага чумы	Всего изучено штаммов	Pgm-признак, %		Пестициногенность (Pst ⁺) и чувствительность к пестицину 1 (Pst [®])	
		Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pst ⁺	Pst [®]
1-я группа*					
Илийский межгорный	190	98,0	2,0	190	–
Мангышлакский	3	94,0	6,0	3	–
Предустюрский	20	94,0	6,0	20	–
Прибалхашский	322	92,0	8,0	316	6
Приаральско-Каракумский	89	99,0	1,0	89	–
Северо-Приаральский	20	99,0	1,0	20	–
Устюртский	80	95,0	5,0	80	–
Всего по 1-й группе	724	95,8	4,2	718	6 (0,8%)
2-я группа*					
Арыскуп-Дарьялыктакырский	21	98,0	2,0	21	–
Бетпақдалинский	60	93,0	7,0	60	–
Кызылкумский	49	96,0	4,0	49	–
Мойынкумский	234	86,0	14,0	234	–
Таукумский	108	92,0	8,0	108	–
Всего по 2-й группе	472	93,0	7,0	472	–
Всего	1196	94,7	5,3	1190	6 (0,5%)

Утрата активности первого приводит к Fra⁻, а второго – к Fra[±] фенотипу, при этом антиген накапливается внутри клетки, но не на поверхности. При Fra⁻ фенотипе происходит снижение вирулентности для морских свинок на 2–5 порядков, но не для белых мышей.

Признак пигментсорбции тесно связан с вирулентностью. По наличию этого признака штаммы были достаточно однородными. Их популяции состояли преимущественно из пигментсорбирующих клеток (94,3 ± 1,7%) (табл. 2).

Из изученных 1196 штаммов 1190 продуцировали пестицин I, но не были чувствительны к нему, за исключением 6 штаммов (0,5%) из Прибалхашского автономного очага чумы (автономный очаг чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений), которые не вырабатывали пестицин 1, но были чувствительными к нему.

Потребности в аминокислотах у разных изолятов могут различаться, что дает набор маркеров для классификации штаммов. Для изучения характера потребностей в факторах роста использовались среды со следующими аминокислотами: среда А – минимальная среда, лишенная аминокислот; комбинация аминокислот №4 – фенилаланин, метионин, цистеин; комбинация аминокислот №6 – фенилаланин, метионин, цистеин, треонин; комбинация аминокислот №7 – фенилаланин, метионин, цистеин, треонин, аргинин. Результаты изучения штаммов *Y. pestis* по потребности в аминокислотах приведены в табл. 3.

В результате исследования выявлено, что из изученных 1196 штаммов чумы нуждаются в фенилаланине, метионине и цистеине – 987 штаммов, зависимы только от треонина – 8 штаммов (из Прибалхашского автономного очага чумы) и зависимы только от аргинина – 29 штаммов (Северо-Приаральский – 1, Мойынкумский – 5, Прибалхашский – 13, Таукумский – 3, Илийский межгорный – 7). По двум анализи-

Таблица 3. Потребности штаммов *Y. pestis* в аминокислотах при 28°C

Наименование автономного очага чумы	Всего изучено штаммов	Зависимость от аминокислот				
		Phe	Met	Cys	Thr	Arg
1-я группа*						
Илийский межгорный	190	183	183	183	–	7
Мангышлакский	3	3	3	3	–	–
Предустюртский	20	20	20	20	–	–
Приаральско-Каракумский	89	89	89	89	–	–
Прибалхашский	322	301	301	301	8	13
Северо-Приаральский	20	19	19	19	–	1
Устюртский	80	80	80	80	–	–
Всего по 1-й группе	724	695	695	695	8	21
2-я группа*						
Арыскуп-Дарьялыктакырский	21	21	21	21	–	–
Бетпақдалинский	60	60	60	60	–	–
Кызылкумский	49	49	49	49	–	–
Мойынкумский	234	229	229	229	–	5
Таукумский	108	105	105	105	–	3
Всего по 2-й группе	472	464	464	464	–	8
Всего	1196	987	987	987	8	29

руемым группам потребность к различным аминокислотам не зависела от эпизоотической активности.

В результате изучения 1196 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 2010–2019 гг., выявлены 84 штамма, атипичных по фенотипическим и молекулярно-генетическим свойствам. Необходимо отметить, что 89,2% (75 шт.) нетипичных штам-

Таблица 4. Праймеры и размеры выявляемых ампликонов

Праймеры	Размер ампликона, п.н.
16sRNA – F/R	362
ripA – F/R	207

Таблица 5. Программа амплификации

№	Шаг	Температура, °С	Время, мин:с	Количество циклов
1	Предварительная денатурация	95	05:00	1
2	Денатурация	95	00:40	40
	Отжиг	58	00:40	
	Элонгация	72	00:40	
3	Дополнительная элонгация	72	7:00	1
4	Хранение	4	∞	1

мов выявлены в автономных очагах чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений (Прибалхашский, Северо-Приаральский и Илийский межгорный). В автономных очагах чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений в 8,3 раза больше нетипичных штаммов по фенотипическим свойствам.

Результаты молекулярно-генетических исследований. 33 штамма, взятые в исследование, были отобраны после изучения фенотипических свойств всех штаммов, выделенных в 2017–2018 гг. в Среднеазиатском пустынном природном очаге чумы: 9 – типичных и 24 – атипичных по фенотипу (с низким содержанием фракции 1 и с содержанием непигментированных (Pgm-) колоний от 50 до 90% и с изменениями биохимических признаков: не ферментирующие арабинозу, мальтозу).

В молекулярно-генетических исследованиях в качестве контроля использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ. Была использована тест-система для мультиплексной ПЦР – набор «Pest-Quest» (Казахстан), в состав которого входят праймеры для одновременной детекции трех видоспецифических мишеней в геноме *Y. pestis*: генов *pst*, *caf1* и *YPO-2088*. Все 33 штамма имели все три целевых гена и, таким образом, являлись типичными представителями вида *Y. pestis*.

Штаммы были проанализированы с помощью праймеров к гену 16sRNA и гену области пигментации *ripA* (табл. 4) для одновременной детекции видоспецифических мишеней в геноме *Y. pestis*.

Анализ проводился путем постановки стандартной ПЦР с учетом результатов реакции методом горизонтального гель-электрофореза. Программа амплификации указана в табл. 5.

Для проведения молекулярно-генетического исследования в поисках генов 16sRNA и *ripA* были взяты 33 штамма *Y. pestis* из Мойынкумского, Кызылкумского, Прибалхашского, Приаральско-Каракумского, Северо-Приаральского, Арыскуп-Дарьялыктакырского и Илийского очагов чумы Казахстана. Результаты представлены в табл. 6.

Тестирование 33 штаммов выявило отсутствие гена *ripA* только у *Y. pestis* 0009 из Кызылкумского очага чумы Республики Казахстан.

Далее штаммы *Y. pestis* были исследованы методом мультилокусного VNTR анализа (MLVA) по 7 локусам. В качестве положительных контролей и для расчета размера ампликонов при типировании были отобраны ДНК референтных штаммов KIM10, CO92, Nepal516 и Pestoides F.

Список исследуемых и контрольных штаммов с указанием источников приведен в табл. 7.

Список VNTR-локусов с нуклеотидными последовательностями использованных в MLVA-7 праймеров отражен в табл. 8.

Таблица 6. Список исследуемых штаммов с результатами анализа праймерами 16sRNA и ripA

№ п/п	Образцы	№ по списку	16sRNA (362 п.н.)	ripA (207 п.н.)
1	Маркер	M		
2	EV	1	++++	-
3	<i>Y. pestis</i> 0001	2	++++	++++
4	<i>Y. pestis</i> 0002	3	++++	++++
5	<i>Y. pestis</i> 0003	4	++++	++++
6	<i>Y. pestis</i> 0004	5	++++	+++
7	<i>Y. pestis</i> 0005	6	++++	++++
8	<i>Y. pestis</i> 0006	7	++++	++++
9	<i>Y. pestis</i> 0007	8	++++	++++
10	<i>Y. pestis</i> 0008	9	++++	-
11	<i>Y. pestis</i> 0009	10	++++	++++
12	<i>Y. pestis</i> 0010	11	++++	++++
13	<i>Y. pestis</i> 0011	12	++++	++++
14	<i>Y. pestis</i> 0012	13	++++	++++
15	<i>Y. pestis</i> 0013	14	++++	+++
16	<i>Y. pestis</i> 0014	15	++++	++++
17	<i>Y. pestis</i> 0015	16	++++	++++
18	<i>Y. pestis</i> 0016	17	++++	++++
19	<i>Y. pestis</i> 0017	18	++++	++++
20	<i>Y. pestis</i> 0018	19	++++	++++
21	<i>Y. pestis</i> 0019	20	++++	++++
22	<i>Y. pestis</i> 0020	21	++++	++++
23	<i>Y. pestis</i> 0021	22	+++	+++
24	<i>Y. pestis</i> 0022	23	++++	++++
25	<i>Y. pestis</i> 0023	24	++++	++++
26	<i>Y. pestis</i> 0024	25	++++	++++
27	<i>Y. pestis</i> 0025	26	++++	++++
28	<i>Y. pestis</i> 0026	27	++++	++++
29	<i>Y. pestis</i> 0027	28	++++	+++
30	<i>Y. pestis</i> 0028	29	++++	++++
31	<i>Y. pestis</i> 0029	30	++++	+++
32	<i>Y. pestis</i> 0030	31	++++	++++
33	<i>Y. pestis</i> 0031	32	++++	++++
34	<i>Y. pestis</i> 0032	33	++++	++++
35	<i>Y. pestis</i> 0033	34	++++	++++
36	Отрицательный контроль	35	Отриц.	Отриц.
37	Положительный контроль	36	++++	+++

Таблица 7. Список штаммов *Y. pestis*, использованных для генотипирования

Штаммы	Источники
KIM10	Референтный штамм, биовар Medievalis
CO92, <i>Y. pestis</i> EV	Референтный штамм, биовар Orientalis
Nepal516, Pestoides F	Референтные штаммы, биовар Antiqua
MK_0001, MK_0002, MK_0003	Штаммы из Мойынкумского очага чумы
KK_0004, KK_0005, KK_0006, KK_0007, KK_0008, KK_0009, KK_0010, KK_0011, KK_0012	Штаммы из Кызылкумского очага чумы
PB_0013, PB_0014, PB_0015, PB_0025, PB_0016, PB_0017, PB_0018, PB_0019, PB_0020, PB_0021, PB_0022, PB_0023, PB_0024	Штаммы из Прибалхашского очага чумы
PK_0026, PK_0027, PK_0028, PK_0029, PK_0030	Штаммы из Приаральско-Каракумского очага чумы
NP_0031	Штаммы из Северо-Приаральского очага чумы
AD_0032	Штаммы из Арыкумско-Дарьялыктакырского очага чумы
I_0033	Штаммы из Илийского очага чумы

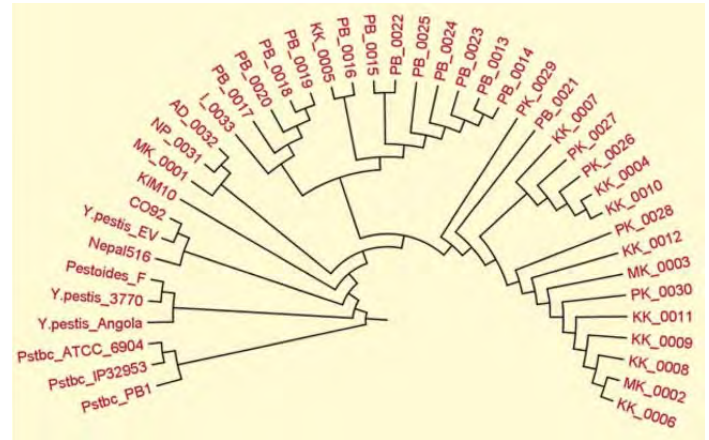


Рисунок. Филогенетическое дерево исследованных 33 штаммов *Y. pestis*.

Как видно из рисунка, все исследуемые штаммы чумного микроба из Мойынкумского, Кызылкумского, Прибалхашского, Приаральско-Каракумского, Северо-Приаральского, Арыкумско-Дарьялыктакырского и Илийского пустынных очагов чумы (Среднеазиатский пустынный очаг, основной носитель – большая песчанка) филогенетически наиболее близки к референтному штамму KIM10, являющемуся представителем биовара Mediaevalis.

В результате анализа среди исследованных штаммов выявлено 18 генотипов, из них 13 (72,2%) уникальных, т.е. не повторяющихся в выборке. Остальные 5 генотипов сформировали 5 кластеров, объединяющих 20 штаммов (60,6%) (от 2 до 6 штаммов в кластере). Согласно данным анализа аллельного полиморфизма (*h*) по 7 локусам (табл. 6) определена большая вариабельность: два локуса были абсолютно инвариабельны ($h = 0$), два локуса практически мономорфны ($0 < h < 0,2$), остальные 3 локуса отличались наибольшим полиморфизмом ($h > 0,5$). Значение дискриминирующего индекса Хантера–Гастона (HGDI) для всех 33 исследованных штаммов составило 0,934.

Следует отметить, что данные, полученные в результате анализа MLVA-7, являются предварительными. Более точные данные будут получены при анализе всех 25 VNTR-локусов (MLVA-25), а также методами, направленными на выявление SNP.

Заключение

Таким образом, по фенотипическим свойствам было изучено всего 1196 культур чумы, из них количество типичных

Амплификация проводилась на приборе Veriti (Applied Biosystems, США). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводилось в 2%-м агарозном геле. Размер продуктов амплификации ДНК исследуемых штаммов чумного микроба определялся исходя из размеров фрагментов маркера молекулярного веса, а также из размеров продуктов амплификации ДНК референтных штаммов.

Анализ филогенетических связей исследуемых штаммов проводился с помощью программы PAUP 4.0b10 (<http://phylosolutions.com/paup-test>). Для иерархической кластеризации был использован алгоритм UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Окончательное оформление филогенетического древа проводилась на графическом редакторе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

На основе данных, полученных методом гель-электрофореза для каждого VNTR-локуса, составлены таблица размеров продуктов амплификации и бинарная матрица.

Полученное филогенетическое древо, обработанное на графическом редакторе FigTree, приведено на рисунке.

Таблица 8. VNTR-локусы, использованные для генотипирования штаммов *Y. pestis*

№	VNTR-локус	Размер повтора	Праймеры	
			Прямой	Обратный
1	yp0120ms01	18	CTAAGCACAAATTGTTATGCTGAACC	TACTGAATCTGCTTCATTGTTCAAA
2	yp1290ms04	17	CGCTGTTGAAGTTTATGTAAGAA	AAATGTAACCTGCCAAACGTG
3	yp2769ms06	60	AATTTTGCTCCCAAATAGCAT	TTTTCCCATGACGAAATAAGTA
4	yp2916ms07	10	ATACCGCTACGATCAGCCTCTAT	ATTTAATATTGATTTTGGGACTTGC
5	yp1335ms46	7	CAGGTTTTACGTTATTTCTGAAGG	CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA
6	yp4280ms62	9	TTTAGTCTTGATTAAGCTGCGTTTT	ACGGAAGACAACCTTATTATTGATG
7	yp1580ms70	9	AAACCAACGGTTCATATTGAATAAA	CTTCTCCGCTATTTTCTCCTACAGA

Таблица 9. Аллельный полиморфизм 7 VNTR-локусов у исследуемых штаммов *Y. pestis*

Локус	Наблюдаемый диапазон кол-ва повторов	Число аллельных вариантов	Индекс варибельности (h)
ms01	11	1	0
ms04	11	1	0
ms06	5–6	2	0,06
ms07	17–19	3	0,54
ms46	35–40	4	0,629
ms62	26–34	8	0,847
ms70	15–21	3	0,176

составило 1132 штамма (94,6%) нетипичных – 64 (5,7%). Из них из автономных очагов чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений типичных – 669 (92,4%), нетипичных – 55 (7,6%), к общему числу всех штаммов доля нетипичных составила 4,6%. Результаты изучения штаммов из очагов с редкими проявлениями (или отсутствием) эпидемических осложнений типичных было 463 (98,0%), нетипичных – 9 (1,9%), что к общему числу всех штаммов составило 0,7%.

В результате молекулярно-генетического анализа среди исследованных штаммов выявлено 18 генотипов, из них 13 (72,2%) уникальных, т.е. не повторяющихся в выборке. Остальные 5 генотипов сформировали 5 кластеров, объединяющих 20 штаммов (60,6%) (от 2 до 6 штаммов в кластере). Согласно данным анализа аллельного полиморфизма (h) по 7 локусам (табл. 6) определена большая варибельность: два локуса были абсолютно инвариабельны ($h = 0$), два локуса практически мономорфны ($0 < h < 0,2$), остальные 3 локуса отличались наибольшим полиморфизмом ($h > 0,5$). Значение дискриминирующего индекса Хантера–Гастона (HGDI) для всех 33 исследованных штаммов составило 0,934.

По фенотипическим свойствам все штаммы являются типичными для пустынных природных очагов чумы Казахстана и филогенетически относятся к представителям биовара *Mediaevalis*.

Анализ результатов показал, что в автономных очагах чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений на 8,3 раза больше штаммов, нетипичных по фенотипическим и молекулярно-генетическим свойствам. Большинство нетипичных штаммов (75 шт.) были выделены из автономных очагов чумы с высокой эпизоотической активностью и частыми проявлениями эпидемических осложнений, что составило 89,2% от общего числа атипичных штаммов. Полагаем, что появление штаммов в течение длительной эпизоотии чумы с измененными фенотипическими и генотипическими свойствами могут вызывать затяжные формы инфекционного процесса.

Таким образом, при проведении эпидмониторинга и профилактических мероприятий в природных очагах чумы необходим дифференцированно-комплексный подход с учетом локализации ядер энзоотий, к которым привязаны населенные пункты, с высоким эпидемическим потенциалом и с учетом фенотипической изменчивости и генетической варибельности чумного микроба. Изменчивость возбудителя, в частности появление различных фенотипов в пределах одной

популяции в течение длительной эпизоотии чумы, может иметь большое значение в длительном поддержании эпизоотии с образованием ядер энзоотий, что способствует сохранению возбудителя чумы в межэпизоотический период.

Информация о финансировании

Исследования проводились при выполнении календарных планов и научно-технической программы 2011–2014 гг. КНЦКЗИ им. М.Айкимбаева и НТП за 2018–2020 гг. по теме «Разработка научных основ единой для Республики Казахстан системы мониторинга, диагностики и микробного коллекционирования возбудителей особо опасных, «возвращающихся», вновь возникающих и завозных инфекций» ННЦООИ им. М.Айкимбаева МЗ РК.

Financial support

Studies were carried out with implementation schedules and technical-scientific program 2011–2014 M.Aikimbayev KSCQZD and TSP for 2018–2020 on the theme «Development of scientific bases of the uniform for the Republic of Kazakhstan the system of monitoring, diagnostics and collectibles microbial pathogens especially dangerous, «returning», emerging and imported infections» of M.Aikimbayev NSCEDI of MH RK.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Зайцев АА. Теоретическое и научно-методическое обоснование использования белковых фракций чумного микроба при создании новых диагностических препаратов и тест-систем. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Ставрополь, 2006, 343 с.
2. Айкимбаев АМ. Чума. Алма-Ата: «Риц Госкомстата»; 1992, 106 с.
3. Абделиев ЗЖ. О влиянии выполнения государственных программ реформирования и развития здравоохранения Республики Казахстан на противочумную службу страны. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. 2013;2(28):2-16.
4. Abdirassilova AA, Abdel ZZ, et al. Development of a Real-time PCR using Fluorescent Hybridization Probes. Journal of Research in Medical and Dental Science. 2020;8(1):26-36.
5. Курманов БК, Атшабар ББ, и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* из Среднеазиатского пустынного и Тянь-Шанского высокогорного очагов чумы. Медицина (Алматы). 2016;12(174):80-7.
6. Некрасова ЛЕ, Темиралиева ГА, Мека-Меченко ТВ, и др. Руководство по изучению штаммов чумного микроба. Алматы, 2001.
7. Мека-Меченко ТВ. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг возбудителя чумы из природных очагов разного типа. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Алматы, 2010, 47 с.
8. Платонов МЕ. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроэволюции *Yersinia pestis*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Оболенск, 2010, 24 с.
9. Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. J Clin Microbiol. 2002 Apr;40(4):1164-73. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1164-1173.2002
10. Платонов МЕ, Евсеева ВВ, Дентовская СВ, Анисимов АП. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013;2:3-12.

11. Гаева АВ, Булгакова ЕГ, Киреев МН, Анисимова ЛВ, Новичкова ЛА, Кутырев ВВ. Внутривидовая дифференциация и определение очаговой принадлежности штаммов чумного микроба методом вычитающего рестрикционного фингер-принтинга. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;4(106):28-31.
12. Terletski V, Michael GB, Schwarz S. Subtracted restriction fingerprinting – a new typing technique using magnetic capture of tagged restriction fragments. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004 May 1;41(1):1-8. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.01.009
13. Аймаханов БК, Абделиев ЗЖ, Калмакова МА, Сагиев ЗА. Особенности межвидового контакта наземных млекопитающих и их блох в поселениях большой песчанки в северо-восточных Кызылкумах. Материалы III международной научной конференции «Зоологические исследования регионов России и сопредельных территорий». Нижний Новгород РФ, 13-14 января 2014, с. 206-210.
14. Абделиев ЗЖ, Атшабар ББ, Сагиев ЗА, Мусагалиева РС, Ниязбеков НШ, Бегимбаева ЭЖ, и др. Краткая пространственная и временная характеристика эпизоотической ситуации по чуме в 2011 году в Казахстане. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра. 2013;2-1(90):142-5.
15. Сагиев ЗА, Абделиев ЗЖ, Абдирасилова АА, Мусагалиева РС, Матжанова АМ, Еремков ГН, и др. Оценка эпизоотической ситуации по чуме Приаральско-Каракумского природного очага чумы Казахстана в весенне-летний период 2013 г. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра. 2015;5(105):75-78.
16. Абдел ЗЖ. Анализ свойств штаммов чумного микроба в природных очагах Казахстана с различным уровнем эпизоотической активности и эпидемических проявлений чумы. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. 2019;2(39):57-63.
17. Portnoy DA, Martinez RJ. Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. Curr Top Microbiol Immunol. 1985;118:29-51. DOI: 10.1007/978-3-642-70586-1_3
- Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2010;4(106):28-31. (In Russian).
12. Terletski V, Michael GB, Schwarz S. Subtracted restriction fingerprinting – a new typing technique using magnetic capture of tagged restriction fragments. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004 May 1;41(1):1-8. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.01.009
13. Aimakhanov BK, Abdeliev ZZ, Kalmakova MA, Sagiev ZA. Osobennosti mezvidovogo kontakta nazemnykh mlekopitayushchikh i ikh blokh v poseleniyakh bol'shoi peschanki v severo-vostochnykh Kyzylkumakh. Proceedings of the III international scientific conference "Zoological studies of Russian regions and adjacent territories". Nizhny Novgorod, Russia, January 13-14, 2014, pp. 206-210. (In Russian).
14. Abdeliev ZZ, Atshabar BB, Sagiev ZA, Musagalieva RS, Niyazbekov NSH, Begimbaeva EZ, et al. Brief space and time characteristics of epizootic plague situation in Kazakhstan in 2011. East Siberian Biomedical Journal. 2013;2-1(90):142-5. (In Russian).
15. Sagiyev ZA, Abdel ZZ, Abdirasilova AA, Mussagalieva RS, Matzhanova AM, Yermekov GN, et al. Evaluation of plague epizootic condition of Prearal-Qaraqym plague focus of Kazakhstan in spring and summer time of 2013. East Siberian Biomedical Journal. 2015;5(105):75-78. (In Russian).
16. Abdel ZZ. Analiz svoystv shtammov chumnogo mikroba v prirodnykh ochagakh Kazakhstana s razlichnym urovnem epizooticheskoi aktivnosti i epidemicheskikh proyavlenii chумы. Karantinnye i zoonoznye infektsii v Kazakhstane. 2019;2(39):57-63. (In Russian).
17. Portnoy DA, Martinez RJ. Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. Curr Top Microbiol Immunol. 1985;118:29-51. DOI: 10.1007/978-3-642-70586-1_3

Информация об авторах:

Абдел Зият Жумадилюлы, кандидат медицинских наук, ассоц. профессор, заведующий лабораторией чумы Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
 Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
 Телефон: (727) 223-3821
 E-mail: ziyatabdel@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2738-6818>

Мека-Меченко Татьяна Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории чумы Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
 Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
 Телефон: (727) 223-3821
 E-mail: tmekamechenko@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6322-0065>

Абдирасилова Айгуль Акзамовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела диагностических препаратов Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
 Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
 Телефон: (727) 223-3821
 E-mail: aigul.abdirasilova@mail.ru
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7308-2113>

Мусагалиева Райхан Сафаровна, кандидат медицинских наук, ассоц. профессор, врач-эпидемиолог отдела экспресс-диагностики и индикации особо опасных инфекций Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан,
 Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
 Телефон: (727) 223-3821
 E-mail: raikhansafar@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6838-2338>

Бегимбаева Эльмира Жуазбаевна, заведующая лабораторией республиканской коллекции микроорганизмов и депозитария возбудителей особо опасных инфекций Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
 Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
 Телефон: (727) 223-3821
 E-mail: ebegimbay@mail.ru
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3662-5806>

References

1. Zaitsev AA. Theoretical and scientific-methodological substantiation of the use of protein fractions of the plague microbe in the creation of new diagnostic drugs and test systems. Diss. Stavropol, 2006, 343 p. (In Russian).
2. Aikimbayev AM. Chuma. Alma-Ata: "RIC of Goskomstat" Publ.; 1992, 106 p. (In Russian).
3. Abdeliev ZZ. O vliyaniy vypolneniya gosudarstvennykh programm reformirovaniya i razvitiya zdavookhraneniya Respubliki Kazakhstan na protivochumnuyu sluzhbu strany. Karantinnye i zoonoznye infektsii v Kazakhstane. 2013;2(28):2-16. (In Russian).
4. Abdirasilova AA, Abdel ZZ, et al. Development of a Real-time PCR using Fluorescent Hybridization Probes. Journal of Research in Medical and Dental Science. 2020;8(1):26-36.
5. Kurmanov BK, Atshabar BB, et al. Genotipirovanie shtammov *Yersinia pestis* iz Sredneaziatskogo pustynnogo i Tyan'-Shanskogo vysokogornogo ochagov chумы. Meditsina (Almaty). 2016;12(174):80-7. (In Russian).
6. Nekrasova LE, Temiralieva GA, Meka-Mechenko TV, et al. Rukovodstvo po izucheniyu shtammov chumnogo mikroba. Alma-Ata, 2001. (In Russian).
7. Meka-Mechenko TV. Microbiological and molecular genetic monitoring of the plague pathogen from natural foci of different types. Diss. Alma-Ata, 2010, 47 p. (In Russian).
8. Molecular genetic study of the diversity and microevolution of *Yersinia pestis*. Diss. Obolensk, 2010, 24 p. (In Russian).
9. Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. J Clin Microbiol. 2002 Apr;40(4):1164-73. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1164-1173.2002
10. Platonov ME, Evseeva VV, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Molecular typing of *Yersinia pestis*. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2013;28(2):41-51.
11. Gaeva AV, Bulgakova EG, Kireev MN, Anisimova LV, Novichkova LA, Kutyrev VV. Intra-species differentiation and determination of the focal belonging of plague microbe strains using subtracted restriction fingerprinting. Problemy Osobo

Утепова Ирина Балапановна, ведущий научный сотрудник отдела менеджмента качества лабораторных исследований Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: utepib@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8088-638X>

Матжанова Алмагуль Муслимовна, и.о. начальника отдела консультативно-организационной и методической работы Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: a.matganova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7614-6848>

Есимсеит Думан Темирбекулы, врач-микробиолог отдела консультативно-организационной и методической работы Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: yessimseit@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2202-9333>

Абделиев Бекмырза Зиятович, научный сотрудник отдела менеджмента научных программ Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: abdelbeck@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4184-6227>

Рысбекова Алтын Канатовна, магистр общественного здравоохранения, врач-микробиолог отдела экспресс-диагностики и индикации особо опасных инфекций Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: rysbekova23@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8684-3425>

Касенова Алтынай Камиевна, врач-микробиолог отдела экспресс-диагностики и индикации особо опасных инфекций Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: kassenovaaltnai@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5557-2909>

Умарова Сауле Кадырбековна, кандидат биологических наук, ученый секретарь Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
Адрес: 050054, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жаянгер, 14
Телефон: (727) 223-3821
E-mail: umarova_59@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2412-9453>

Information about authors:

Ziyat Zh. Abdel, MD, PhD, assoc. professor, head of the laboratory of plague, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: ziyatabdel@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2738-6818>

Tatiana V. Meka-Mechenko, MD, PhD, DSc, chief researcher of the laboratory of plague, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: tmekamechenko@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6322-0065>

Aigul A. Abdirassilova, MD, PhD, leading researcher of the department of diagnostic preparations and phages, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: aigul.abdirassilova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7308-2113>

Raikhan S. Mussagalieva, MD, PhD, assoc. professor, epidemiologist department of express-diagnostics and indication of particularly dangerous infections, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: raikhansafar@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6838-2338>

Elmira Zh. Begimbayeva, head of the laboratory of the republican collection of microorganisms and depository agents of especially dangerous infections, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: ebegimbay@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3662-5806>

Irina B. Utepova, leading research fellow, department of quality management of laboratory researches, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: utepib@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8088-638X>

Almagul M. Matzhanova, acting head of advisory department-organizational and methodical work, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: a.matganova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7614-6848>

Yessimseit D. Temirbekuly, doctor-microbiologist, division of the advisory-methodical and organizational work, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: yessimseit@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2202-9333>

Bek Z. Abdeliyev, researcher of the department of management of scientific programs, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: abdelbeck@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4184-6227>

Altyn K. Rysbekova, master of public health, the microbiologist of the division of express-diagnostics and indication of particularly dangerous infections, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: rysbekova23@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8684-3425>

Altnay K. Kassenova, doctor-microbiologist department of express-diagnostics and indication of particularly dangerous infections, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: kassenovaaltnai@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5557-2909>

Saule K. Umarova, PhD (Biological Sciences), scientific secretary, M. Aikimbaev National Research Center of Especially Dangerous Infections Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
Address: 14 Zhakhanger str., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan
Phone: (727) 223-3821
E-mail: umarova_59@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2412-9453>

Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий, характеризующихся множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам

А.А.Филиппова^{1,2}, М.Ю.Рубцова¹, М.М.Уляшова¹, Н.К.Фурсова²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

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

Устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам является глобальной проблемой здравоохранения. В последние годы отмечается рост числа мультирезистентных бактерий, устойчивых одновременно к разным группам антибиотиков, в том числе бета-лактамам. Основным механизмом устойчивости грамотрицательных бактерий к этому классу антибиотиков является синтез разнообразных бета-лактамаз, гидролизующих молекулу антибиотика. Обзорная статья посвящена анализу данных об экспрессии генов бета-лактамаз у мультирезистентных бактерий и молекулярно-генетических методов их определения в РНК-транскриптах.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, транскриптом, молекулярно-генетические методы, бета-лактамазы

Для цитирования: Филиппова А.А., Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Фурсова Н.К. Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий, характеризующихся множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Бактериология. 2020; 5(3): 34–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-34-46

Expression of beta-lactamase genes in multidrug-resistant bacteria

A.A.Filippova^{1,2}, M.Yu.Rubtsova¹, M.M.Ulyashova¹, N.K.Fursova²

¹M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

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

Antimicrobial resistance is a global public health problem. In recent years, increasing of multi-drug resistant bacteria has been noted, which are resistant to different antimicrobial groups simultaneously, including beta-lactams. The main mechanism of anti-beta-lactam resistance in gram-negative bacteria is synthesis of various beta-lactamases that hydrolyze the antibiotics. The review is devoted to the analysis of data on the expression of beta-lactamase genes by multi-drug resistant bacteria and molecular genetic methods for their determination in RNA transcripts.

Key words: antibiotic resistance, transcriptome, molecular genetic methods, beta-lactamases

For citation: Filippova A.A., Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Fursova N.K. Expression of beta-lactamase genes in multidrug-resistant bacteria. Bacteriology. 2020; 5(3): 34–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-34-46

Открытие антибиотиков в прошлом веке совершило революцию в лечении инфекционных заболеваний человека, вызванных бактериями. Многие микроорганизмы синтезируют антибиотики, препятствующие росту микроорганизмов-конкурентов в окружающей среде, подобный способ контроля численности популяций микроорганизмов распространен в различных природных системах [1].

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

Статья поступила 05.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

Бактерии могут хорошо адаптироваться к различным факторам окружающей среды: для защиты от собственных антибиотиков и антибиотиков, продуцируемых другими микроорганизмами, у них выработаны различные механизмы устойчивости. С началом активного применения антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний начался экспоненциальный рост и масштабное распространение резистентности.

For correspondence:

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

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

The article was received 05.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

стентных к антибиотикам патогенных бактерий. В настоящее время антибиотикорезистентность возбудителей инфекционных заболеваний человека является глобальной проблемой человечества [2, 3]. Развитие антибиотикорезистентности по скорости существенно превосходит появление новых антибиотиков. Быстрое распространение устойчивых к антибиотикам форм бактерий обусловлено локализацией генов резистентности на мобильных генетических элементах и способностью бактерий к горизонтальной передаче генов [4, 5].

Неконтролируемое и часто неоправданное использование антибиотиков в медицине, ветеринарии и особенно в сельском хозяйстве (более 80% от объема производимых антибиотиков применяется в ветеринарии и животноводстве) создает условия, при которых огромное количество антибактериальных препаратов попадает в окружающую среду. В воде, почве и других объектах происходит формирование резистентности у существующих там непатогенных микроорганизмов, которые могут затем передавать новые или измененные гены резистентности другим микроорганизмам [6–9]. В результате патогенные микроорганизмы вместе с микроорганизмами окружающей среды представляют огромный резервуар генетических детерминант резистентности.

Основными механизмами резистентности бактерий к антибиотикам являются: снижение проницаемости клеточной мембраны вследствие мутаций в поринах – белковых каналах в наружной мембране грамотрицательных бактерий для транспорта различных веществ [10], вывод антибиотиков из клетки благодаря системам эффлюкса [11, 12], ферментативная модификация антибиотиков или мишени их действия [13, 14]. Сочетание различных механизмов резистентности вместе с сочетанием генов устойчивости к разным антибиотикам приводит к формированию мультирезистентных, экстремально резистентных и панрезистентных патогенов [15–17].

Появление возбудителей инфекций, устойчивых одновременно к нескольким типам антибиотиков, существенно ограничивает выбор адекватной лекарственной терапии. Сдерживающим фактором развития резистентности должно явиться рациональное применение антибактериальных препаратов и выработка эффективных стратегий преодоления антибиотикорезистентности [18]. Для этого необходимо понимание молекулярных механизмов формирования резистентности и наличие адекватных высокотехнологичных методов идентификации бактерий, устойчивых к антибиотикам.

Более половины от всех используемых в медицине антибиотиков составляют бета-лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы), и устойчивость к этой функциональной группе препаратов является самой распространенной [19]. Преимущественным механизмом резистентности грамотрицательных бактерий к бета-лактамам является ферментативный гидролиз бета-лактамного кольца ферментами – бета-лактамазами. Гены бета-лактамаз чаще всего локализованы на мобильных генетических элементах, что позволяет им быстро и широко распространяться [20]. Клинические штаммы бактерий зачастую характеризуются наличием у них одновременно нескольких генов, кодирующих бета-лактамазы, отличающиеся строением активного центра, субстратной специфичностью и каталитической ак-

тивностью. Имеются данные, что гены бета-лактамаз могут быть обнаружены не только в геномах резистентных, но также и у чувствительных к антибиотикам бактерий как «молчащие», неэкспрессирующиеся [21].

Подробные исследования бета-лактамаз, проводимые с момента их выделения из клинических образцов, были в первую очередь направлены на исследования структуры, механизмов действия и эпидемиологии бета-лактамаз. В последнее время стали активно развиваться исследования по изучению механизмов регуляции экспрессии генов этих ферментов и изучению условий активации и подавления экспрессии. Данный обзор посвящен анализу данных об экспрессии генов бета-лактамаз у резистентных к антибиотикам бактерий и методам их определения.

Разнообразие и распространенность бета-лактамаз

К настоящему времени описано около 2800 бета-лактамаз, выделенных из патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний [22, 23]. По классификации, предложенной Амблер, на основании гомологии первичных последовательностей все суперсемейство ферментов подразделяется на 4 класса – А, В, С и D [24]. Ферменты классов А, С и D содержат серин в активном центре, а ферменты класса В являются металло-бета-лактамазами и содержат ионы Zn^{2+} в активном центре [25]. На основе различий в субстратной специфичности и способности гидролизовать бета-лактамы антибиотики, относящиеся к разным группам, различают бета-лактамазы широкого спектра (гидролизуют пенициллины и цефалоспорины I поколения), бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) (гидролизуют пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений) и карбапенемазы (гидролизуют карбапенемы и другие бета-лактамы).

Наиболее распространены у клинических штаммов – возбудителей инфекционных заболеваний человека – сериновые бета-лактамазы молекулярного класса А [22]. Среди них до конца 1990-х гг. наиболее распространенными были бета-лактамазы TEM- и SHV-типов, которые образуют большие семейства, каждое более чем из 200 представителей. Они включают в себя фермент-родоначальник (TEM-1 и SHV-1) и наборы мутантных форм, некоторые из которых относятся к БЛРС. Позже преобладающими во многих регионах мира стали бета-лактамазы CTX-M-типа, все относящиеся к БЛРС [26, 27]. Наиболее часто встречающимся ферментом этого типа в странах Европы, Азии, Африки и США является CTX-M-15, в Кореи и Южной Америке – CTX-M-14. Наиболее распространенными карбапенемазами являются бета-лактамазы KPC-типа, относящиеся к классу А [28]. Известно более 20 вариантов данного фермента, наиболее распространенными среди них являются KPC-2 и KPC-3. Ферменты данного типа способны гидролизовать цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы [29, 30]. Бактерии, содержащие ген данной бета-лактамазы, часто характеризуются множественной лекарственной устойчивостью [31]. В России описаны бактерии-продуценты бета-лактамазы KPC-2 [29].

Бета-лактамазы класса С, включающие AmpC-тип ферментов, характеризуются высокой активностью в отношении цефалоспоринов [32]. Среди ферментов класса D наибольшую клиническую значимость имеют бета-лактамаза OXA-48, распространенная у представителей семейства

Enterobacteriaceae, и бета-лактамаза ОХА-23, встречающаяся у *Acinetobacter baumannii* [33]. Бета-лактамазы данного типа гидролизуют оксациллин и карбапенемы [34, 35]. Карбапенемаза ОХА-48, впервые обнаруженная в 2001 г. в Турции, к настоящему времени широко распространена в Европе, Канаде, Корее, на Ближнем Востоке, в том числе у мультирезистентных штаммов, реже встречается в Америке [34, 36].

Среди металло-бета-лактамаз (класс В) наиболее распространены ферменты VIM- и IMP-типов. Бета-лактамазы VIM-типа имеют широкую субстратную специфичность: они гидролизуют пенициллины, большинство цефалоспоринов и карбапенемы, но не гидролизуют азтреонам [37]. Ферменты этого типа были впервые обнаружены в Западной Европе в изолятах *Pseudomonas aeruginosa* [38], в настоящее время встречаются в различных регионах, в том числе у *Klebsiella pneumoniae*. Бета-лактамазы IMP-типа имеют похожую субстратную специфичность, впервые они были обнаружены в Японии в 1990 г., преимущественно в штаммах *Escherichia coli* и *K. pneumoniae*. Особенно угрожающим явилось распространение по всему миру металло-бета-лактамаз NDM-типа, продуценты которых получили название «супербактерий» из-за своей панрезистентности. Данная карбапенемаза, впервые обнаруженная в Индии в 2009 г. [39], затем была описана у многих видов патогенных бактерий *Enterobacteriales*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [40, 41]. Данный фермент имеет низкий уровень гомологии с другими ферментами класса В, например, с бета-лактамазами VIM-типа он составляет ~32% [42].

По данным ВОЗ, наибольшую угрозу для здравоохранения представляют мультирезистентные бактерии видов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [43]. В ряде стран, в том числе в России, доля таких штаммов составляет более 50%. При этом отмечается рост числа бактерий, устойчивых к карбапенемам, особенную среди *K. pneumoniae*. Гены эпидемически значимых бета-лактамаз в основном локализуются на плазмидах, что обеспечивает их быстрое распространение среди возбудителей как внутри-, так и внебольничных инфекций. У мульти- и панрезистентных бактерий на плазмидах располагаются также гены устойчивости к другим классам антибиотиков – аминогликозидам, фениколам, макролидам, хинолонам, сульфаниламидам. Описаны супербактерии, содержащие в геноме более 15 генов антибиотикорезистентности: гены бета-лактамаз TEM, ОХА-, СТХ-М-, CMY-, GIM-, VIM-, NDM-, KPC-типов; гены аминогликозид-модифицирующих ферментов Aac, Aad, Ant, Aph; гены эффлюксных насосов TetABC, MexABCDEF, а также большое количество IS-элементов и транспозонов [44].

Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий. Индукция экспрессии генов бета-лактамаз хромосомной локализации

Изучение механизмов регуляции экспрессии генов антибиотикорезистентности включает несколько направлений: определение факторов, влияющих на усиление или подавление экспрессии генов в зависимости от условий культивирования, и изучение особенностей строения генетического аппарата бактерий для осуществления этих процессов.

У многих видов бактерий экспрессия бета-лактамаз индуцируется в ответ на действие бета-лактаманых антибиотиков. При этом у грамположительных бактерий экспрессия бета-лактамаз индуцируется непосредственно бета-лактамами, в то время как у грамотрицательных бактерий чаще осуществляется косвенно (высвобождением муропептидов из пептидогликана после их взаимодействия с антибиотиком).

Путь *blaZ-blaR1-blal* у грамположительных бактерий

У грамположительных бактерий (например, *Staphylococcus aureus*) устойчивость к бета-лактамам часто обеспечивается экспрессией бета-лактамазы BlaZ [45, 46], которая индуцируется антибиотиком. Транскрипция гена *blaZ* контролируется системой *blaZ-blaR1-blal* [47], которая включает в себя гены бета-лактамазы BlaZ, ее ДНК-репрессора Blal и белка-преобразователя сигнала BlaR1, кластеризованные либо на бактериальной хромосоме, либо на плазмиде. В отсутствие бета-лактаманого антибиотика ДНК-репрессор Blal подавляет транскрипцию гена *blaZ* при связывании с консервативным фрагментом TACA/TGTA, расположенным в области промотора *blaZ* (рис. 1А). Экспрессия гена *blaZ* инициируется при необратимом связывании бета-лактама с мембрано-ассоциированным рецептором BlaR1 (рис. 1Б). Этот рецептор является трансмембранным белком с С-концевым сенсорным доменом BlaRS, расположенным на поверхности клетки. Сенсорный домен BlaRS структурно гомологичен сериновым бета-лактамазам класса D. Ацилирование белка BlaRS приводит к аутопротеолитическому расщеплению цитоплазматического домена BlaR1. Расщепленная форма BlaR1 является активной цинковой металлопротеазой, которая может инактивировать репрессор Blal, приводя к диссоциации Blal от промотора гена *blaZ* и последующей экспрессии этого гена [48, 49].

Путь *AmpG-AmpR-AmpC* у грамотрицательных бактерий

У многих бактерий порядка *Enterobacteriales* и у *P. aeruginosa* экспрессия бета-лактамаз класса С (AmpC-типа) индуцируется бета-лактаманых антибиотиками (рис. 2), и этот процесс тесно взаимосвязан с рециркуляцией клеточной стенки бактерий [50–53]. При связывании бета-лактаманых антибиотиков со своей мишенью, пенициллин-связывающими белками (ПСБ), активируются литические трансгликозилазы, в результате чего в периплазме начинается распад пептидогликана и накапливаются продукты его гидролиза – муропептиды GlcNAc-ангидро-MurNAc. Они переносятся в цитоплазму через трансмембранный белок-транспортер AmpG, где распадаются на 1,6-ангидромуро-три-, тетра- и пентапептиды с участием β-N-ацетилглюкозаминидазы NagZ. Эти пептиды при взаимодействии с регулятором AmpR являются индукторами экспрессии хромосомно-кодируемых бета-лактамаз AmpC-типа. AmpR является регулятором транскрипции типа LysR, кодируемый его ген располагается непосредственно перед геном *ampC* [54]. В отсутствие антибиотика во внешней среде активаторная функция AmpR ингибирована клеточным метаболитом – предшественником синтеза клеточной стенки, UDP-MurNAc-пентапептидом. Индуцирующие муропептиды вытесняют связанный UDP-MurNAc-пентапептид, вызывая конформационные изменения в молекуле AmpR, которые приводят к активации транскрипции гена *ampC*. Сайт связывания AmpR находится в об-

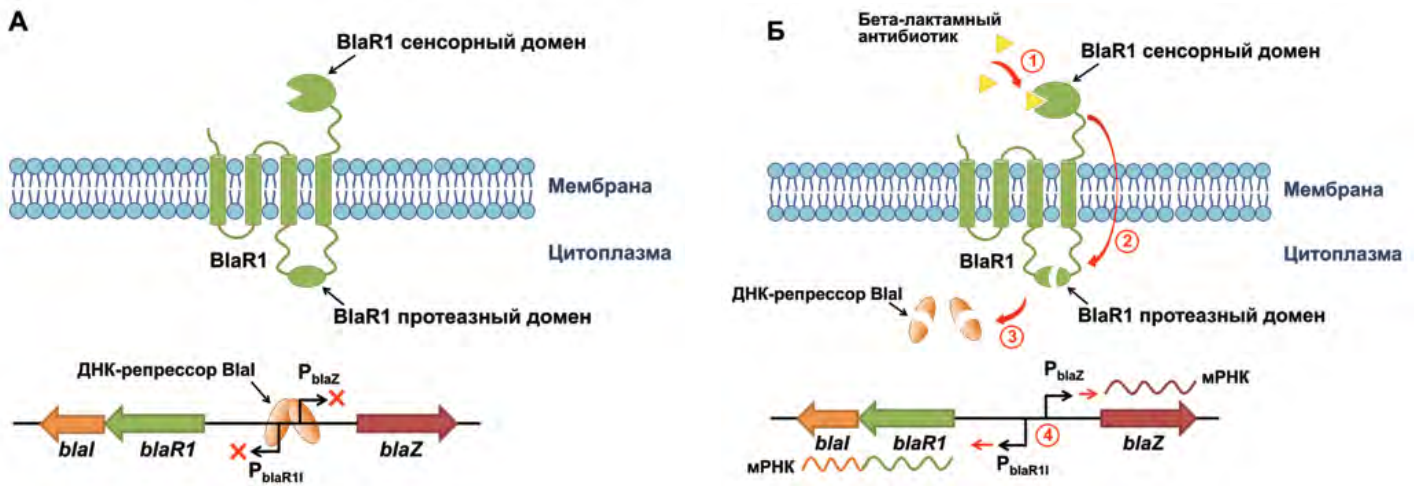


Рис. 1. Индукция экспрессии бета-лактамазы BlaZ бета-лактамами антибиотиками у грамположительных бактерий: А – в отсутствии бета-лактаманного антибиотика: ДНК-репрессор BlaI связан в области промоторов *blaZ/blaR1* и подавляет экспрессию генов в обоих направлениях; Б – в присутствии бета-лактаманного антибиотика: 1) связывание бета-лактаманного антибиотика с сенсорным доменом BlaR1, 2) аутопротеолитическое расщепление протеазного домена BlaR1, 3) протеолиз и последующая диссоциация ДНК-репрессора BlaI с промоторов *blaZ/blaR1*, 4) транскрипция генов *blaZ*, *blaR1* и *blaI* (Lautenschlager et al., 2020 [113], с изменениями).

ласти последовательности нуклеотидов на 39 п.н. выше сайта начала транскрипции *ampC* (от -40 до -88) [50].

У разных бактерий существуют разные варианты регуляторного пути AmpG-AmpR-AmpC. AmpR у *P. aeruginosa* является глобальным транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию генов бета-лактамаз, протеаз, сигналов кворума и ряда факторов вирулентности [55, 56]. У некоторых бактерий, например, *E. coli* и *Shigella* spp., отсутствует ген *ampR*, что приводит к низкому уровню конститутивной экспрессии гена *ampC*. Этот ген у *E. coli* в основном регулируется аттенуаторной последовательностью, расположенной в области промотора. Сверхэкспрессия *ampC* наблюдается либо при мутациях аттенуатора, либо при введении регулятора *AmpR* извне. У *Salmonella* spp. хромосомный тандем генов *ampC-ampR* обычно отсутствует, но клинические штаммы сальмонелл могут приобретать его в ходе горизонтального переноса генов [53]. Экспериментально было показано, что инактивация AmpG приводила к восстановлению чувствительности бактерий к бета-лактамам даже у панрезистентных клинических изолятов *P. aeruginosa* [57]. Мутации в гене *lagZ* также снижали уровень экспрессии генов *ampC*, что повышает чувствительность бактерий к бета-лактамам [58, 59].

Еще одним ключевым ферментом в данной многокомпонентной системе регуляции является цитоплазматическая N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза AmpD, которая может отщеплять створчатые пептиды от ангидро-MurNAc или GlcNAc-ангидро-MurNAc, снижая концентрацию индуцирующих муропептидов и уменьшая избыточную продукцию AmpC. Наиболее распространенным механизмом, приводящим к суперпродукции AmpC и резистентности к бета-лактамам у клинических штаммов *Enterobacteriales* и *P. aeruginosa*, являются мутации в гене *ampD* [60]. *P. aeruginosa* имеют три различных гомолога AmpD: AmpD, AmpDh2 и AmpDh3, их последовательная инактивация приводит к ступенчато повышающейся продукции AmpC [61, 62]. Удаление всех трех генов AmpD приводит к значительному увеличению уровней резистентности к бета-лактамам, включая це-

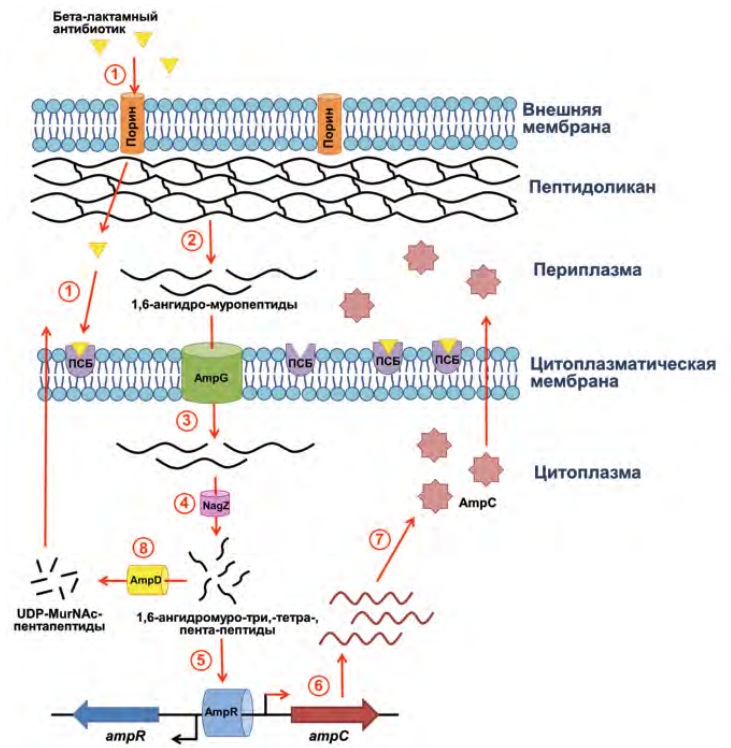


Рис. 2. Индукция экспрессии бета-лактамазы AmpC бета-лактамами антибиотиками у грамотрицательных бактерий порядка *Enterobacteriales* и *P. aeruginosa*: 1 – проникновение в клетку и связывание бета-лактаманного антибиотика с ПСБ; 2 – активация литических трансгликозилаз, которые расщепляют пептидогликан до 1,6-ангидро-муропептидов; 3 – перенос 1,6-ангидро-муропептидов в цитоплазму через трансмембранный белок-транспортер AmpG; 4 – расщепление 1,6-ангидро-муропептидов до 1,6-ангидромуро-три-, тетра- и пентапептидов (индуцирующие муропептиды), катализируемое β -N-ацетилглюкозаминидазой NagZ; 5 – взаимодействие индуцирующих муропептидов с регулятором транскрипции AmpR; 6 – транскрипция *ampC*; 7 – синтез бета-лактамазы AmpC; 8 – расщепление индуцирующих муропептидов до UDP-MurNAc-пентапептидов, катализируемое N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазой AmpD (Lister et al., 2009 [114], с изменениями).

фалоспорины и монобактамы, из-за полной дерепрессии экспрессии гена *ampC* [63].

Двухкомпонентные регуляторные системы у грамотрицательных бактерий

Другой механизм индукции продукции бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий реализуется через активность двухкомпонентных регуляторных систем (ДКРС) [53, 64, 65]. ДКРС присутствуют у многих видов бактерий и являются одними из основных механизмов реагирования бактерий на сигналы окружающей среды. Они состоят из сенсорного белка-рецептора – гистидиновой киназы (ГК) – и соответствующего регулятора ответа (РО). ГК, как правило, представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, который имеет гистидин-содержащий фосфотрансферазный домен и АТФ-связывающий домен. РО является мультидоменным белком, содержащим домен-акцептор и эффекторный домен, часто обладающий ДНК-связывающей активностью. РО локализуется в цитоплазме. При стимуляции сигналом окружающей среды ГК аутофосфорилируется, перенося фосфатную группу с АТФ на консервативный остаток гистидина. Затем фосфатная группа переносится с ГК на консервативный аминокислотный остаток РО (как правило, аспартат). В фосфорилированном РО происходят конформационные изменения, активирующие его эффекторный домен. Этот домен, в свою очередь, действует в качестве фактора транскрипции, влияя на экспрессию генов посредством связывания со специфическими участками хромосомной ДНК или через другие косвенные механизмы (рис. 3).

С каждым годом появляется все больше данных о том, что ДКРС участвуют в формировании устойчивости бактерий к различным классам антибиотиков. У *E. coli*, например, осморегуляторная двухкомпонентная система *EnvZ/OmpR* контролирует дифференциальную экспрессию поринов внешней мембраны *OmpF* и *OmpC*, через которые осуществляется пассивная и неспецифическая диффузия низкомолекулярных гидрофильных веществ, в том числе антибиотиков [66]. Ряд ДКРС регулируют экспрессию бета-лактамаз и, следовательно, важны для формирования устойчивости к бета-лактамам. Примерами таким систем являются *BlrAB*, которая важна для регуляции экспрессии трех бета-лактамаз у *Aeromonas* spp.: карбапенемазы класса В (*CrpA*), цефалоспориныазы класса С (*Sep*) и пенициллиназы класса D (*Amp*) [67], а также *CreBC*, которая является регулятором экспрессии генов бета-лактамаз и других генов у *E. coli* и *P. aeruginosa* [68, 69]. Было показано, что степень гомологии между системами *CreBC* и *BlrAB* является достаточно высокой и составляет около 70%. Их компоненты-гомологи *CreB* и *BlrA* действуют как регуляторы ответа, воздействующего на сенсорные киназы *CreC* и *BlrB*. Большинство сенсорных киназ грамотрицательных бактерий реагируют на изменение концентрации периплазматического или цитоплазматического лиганда – либо непосредственно, либо через некоторый дополнительный белковый компонент [70]. Показано, что системы *BlrAB* и *CreBC* специфически реагируют на ингибирование низкомолекулярных ПСБ (например, ПСБ4) некоторыми бета-лактамами [71]. Скорее всего, как и в случае *AmpG-AmpR-AmpC*-регуляции, индукторами данных систем могут являться продукты распада пептидогликана, но без необходимости их переноса в цитоплазму [72]. В ряде ис-

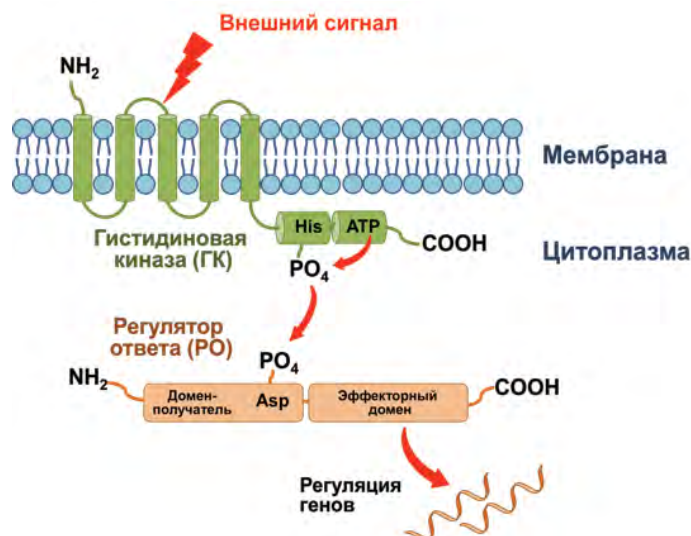


Рис. 3. Схема двухкомпонентной регуляторной системы (Podglajen et al., 2007 [115], с изменениями).

следований было показано, что регуляторы ответа систем *BlrAB* и *CreBC* запускают экспрессию бета-лактамаз путем распознавания определенных сигнальных последовательностей, расположенных в промоторе гена бета-лактамазы, при этом чем больше этих последовательностей, тем выше уровень экспрессии гена [73].

Еще один пример двухкомпонентной регуляторной системы был описан при изучении механизма регуляции экспрессии хромосомной карбенициллин-гидролизующей бета-лактамазы класса А (*CARB*) у *Vibrio parahaemolyticus* [74]. Было показано, что ген, кодирующий данную бета-лактамазу, является частью регулона новой ДКРС (*VbrK/VbrR*). Сенсорная гистидинкиназа *VbrK* связывается непосредственно с бета-лактамым антибиотиком и передает сигнал на регулятор ответа *VbrR*, который контролирует экспрессию гена бета-лактамазы *CARB*. Данный механизм был подтвержден следующими данными: делеция *VbrK* или *VbrR* значительно снижала экспрессию бета-лактамазы и устраняла устойчивость к бета-лактамам; активация *VbrK* специфически запускалась бета-лактамыми антибиотиками, но не другими лактамами; единичные аминокислотные замены в сенсорном домене *VbrK* изменяли его специфичность к бета-лактамам. При связывании бета-лактама с сенсорным доменом *VbrK* происходят конформационные изменения, которые приводят к более тесной ассоциации с доменом АТФазы и последующему фосфорилированию остатка гистидина. Таким образом, бактерии могут быстро реагировать на присутствие бета-лактамов в окружающей среде до того, как клеточная стенка бактерии будет повреждена. Такое прямое распознавание бета-лактамов гистидинкиназой без каких-либо затрат на целостность клеточной стенки может представлять собой новый эволюционно благоприятный механизм защиты от бета-лактаменных антибиотиков.

Индукция экспрессии генов бета-лактамаз плазмидной локализации

Эволюция бактериальных штаммов, приведшая к возникновению и распространению мульти-, экстремальной- и панрезистентности в большой степени обусловлена обменом генетическими детерминантами устойчивости благодаря

мобильным генетическим элементам (инсерционным вставкам, транспозонам, генным кассетам/интегронам, плазмидам и интегративным конъюгативным элементам), способным перемещаться внутри одной или между различными молекулами ДНК [75]. Эти элементы играют центральную роль в обеспечении горизонтального переноса генов и поэтому способствуют приобретению и распространению генов устойчивости. Инсерционные последовательности (IS-элементы) и транспозоны представляют собой дискретные сегменты ДНК, способные перемещать связанные с ними гены устойчивости практически случайным образом на новые участки в различных молекулах ДНК в одной клетке. Интегроны используют сайт-специфическую рекомбинацию для перемещения генов устойчивости между определенными сайтами. Поскольку данные типы мобильных элементов часто присутствуют в геноме клетки в нескольких экземплярах и расположены на различных участках, они также могут способствовать гомологичной рекомбинации (обмену последовательностями между идентичными или родственными сегментами нуклеотидной последовательности). Межклеточные механизмы генетического обмена включают конъюгацию/мобилизацию, опосредованную плазмидами и интегративными конъюгативными элементами; трансдукцию, осуществляемую посредством бактериофагов, и трансформацию вследствие захвата внеклеточной ДНК. Эволюция мультирезистентности в данном случае обусловлена взаимодействием различных типов мобильных генетических элементов и механизмов их обмена между бактериями.

IS-элементы наиболее часто локализируются перед генами бета-лактамаз, влияя на экспрессию данных генов [76–78]. Эти последовательности представляют собой небольшие мобильные генетические элементы, включающие один или два гена транспозазы, и делятся на группы в зависимости от типа ключевых аминокислот в активном центре транспозазы и механизма транспозиции. Он может быть консервативным, когда IS-элемент вырезается из донорного участка ДНК и вставляется в реципиентный, или репликативным – по принципу копирования и вставки.

Для некоторых оксациллиназ, например OXA-58, установлено, что инсерционная вставка ISAb3 обуславливает гиперпродукцию этого фермента и обеспечивает устойчивость к карбапенемам [77, 79]. При изучении штамма *A. baumannii*, продуцента другой оксациллиназы – OXA95, было показано, что действие имипинема в концентрациях до 0,5 мг/л приводило к транспозиции ISAb1, расположенного перед геном бета-лактамазы [80]. В результате экспрессия гена бета-лактамазы увеличивалась в 20 раз по сравнению с экспрессией гена в отсутствие антибиотика. Данный механизм транспозиции IS-элементов играет регуляторную роль в формировании устойчивости к карбапенемам.

У грамотрицательных бактерий описаны примеры IS-элементов, несущих последовательность сильного промотора, обеспечивающего эффективную экспрессию одного или нескольких ассоциированных с ними генов антибиотикорезистентности. Инсерционные последовательности могут перемещать гены резистентности в составе единого составного транспозона – фрагмента ДНК, ограниченного двумя копиями IS-элементов. Так, гены бета-лактамаз TEM-типа, включая гены БЛРС и устойчивых к ингибиторам бета-

лактамаз вариантов, всегда обнаруживаются либо в составе транспозонов Tn1, Tn2, Tn3, либо в их фрагментах, либо в их гибридах [81]. Описан гибридный транспозон Tn1331, несущий гены антибиотикорезистентности, являющийся производным транспозона Tn3 и интегрона класса 1 [82]. Достаточно часто встречаются гибридные элементы, сходные в отдельных своих частях с транспозонами Tn1331, Tn1 или Tn2, в том числе в ассоциации с генами *blaKPC* [83]. Транспозон Tn4401, несущий разные варианты генов карбапенемаз KPC-типа, также принадлежит к большому семейству Tn3, но имеет низкую степень гомологии с другими представителями этого семейства. Известно несколько вариантов Tn4401, у которых описаны два промотора, управляющие экспрессией гена *blaKPC* [84]. Роль промоторов, расположенных перед генами бета-лактамаз, была показана и для экспрессии бета-лактамаз других типов [85].

Гены бета-лактамаз могут располагаться на плазмидах как независимые структуры, так и в составе сложных интегროнов. Показано, что основным фактором, индуцирующим экспрессию генов антибиотикорезистентности, является присутствие молекул антибиотиков [85, 86]. Экспериментально продемонстрирована индукция экспрессии генов бета-лактамаз различными группами бета-лактамов, включая цефалоспорины [85, 87], оксациллины [88] и карбапенемы [86]. Например, Zhao et al. в своей работе изучали регуляцию экспрессии клинически значимых пенициллиназ, БЛРС и карбапенемаз у штаммов *K. pneumoniae*. Было показано, что экспрессия ферментов TEM-1, CTX-M-14, SHV-11 и OXA-1 (но не KPC-2) в значительной степени индуцировалась цефотаксимом и пенициллином. Однако после дополнительной обработки клозантелом (салициланилидный антигельминтик, который является доказанным ингибитором бактериальных гистидинкиназ) уровни мРНК, соответствующие вышеперечисленным ферментам, резко снижались в зависимости от дозы препарата. На основе полученных результатов авторы сделали вывод, что экспрессия бета-лактамаз TEM-, SHV, CTX-M- и OXA-типов у клинических штаммов *K. pneumoniae* может быть индуцибельной и, вероятнее всего, регулируется посредством ГК-зависимых ДКРС [89].

Методы определения экспрессирующихся генов антибиотикорезистентности

Молекулярно-генетические методы, основанные на определении полной или частичной последовательности нуклеотидов генетических детерминант антибиотикорезистентности, широко применяются при изучении бактерий, резистентных к антибиотикам. Ограничением большинства из этих методов является то, что они выявляют определенные генетические детерминанты, ассоциированные с антибиотикорезистентностью, но не отвечают на вопрос, экспрессируются ли они. Это может приводить к ложноположительным результатам детекции антибиотикорезистентных бактерий. Например, недавно были описаны штаммы бактерий, несущих гены антибиотикорезистентности, в том числе хромосомные гены бета-лактамаз, но фенотипически чувствительных к антибиотикам [21, 90]. Такие гены могут быть ассоциированы с неактивными промоторами и поэтому не экспрессироваться. Но при этом бактерии могут передать гены ан-

тибиотикорезистентности другим бактериям, имеющим эффективные промоторы [91, 92]. Бактерии с «молчащими», неэкспрессирующимися генами устойчивости к антибиотикам пока мало исследованы.

Методы определения экспрессирующихся генов в большинстве своем основаны на выявлении транскриптов этих генов в пуле общей РНК, путем получения из нее библиотек кДНК (комплементарной ДНК) в реакции обратной транскрипции, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первые разработанные методы анализа РНК-транскриптов были основаны на электрофоретическом разделении продуктов амплификации с использованием дополнительных программ для анализа цифровых изображений [90, 92], однако чувствительность и точность этих методов была низкой. В таблице представлены примеры опубликованных научных работ, посвященных данной проблеме.

РНК-секвенирование

Для определения полных последовательностей экспрессируемых генов разработаны технологии РНК-секвенирования. Они используются для изучения структуры РНК, механизмов процессов трансляции, анализа дифференциальной экспрессии генов, включая механизмы экспрессии генов в единичных клетках [93]. Для обогащения фракции общей РНК можно проводить отбор поли-dATP-содержащих мРНК с помощью магнитных или целлюлозных бусин, на которых иммобилизованы праймеры, содержащие

олиго-dТТР-участки [94]. Библиотеки кДНК секвенируют с использованием различных высокопроизводительных платформ, например Illumina. Затем проводится обработка результатов, включающая выравнивание последовательностей, сборку транскриптома, нормализацию и статистический анализ значимости изменений в уровнях экспрессии отдельных генов или выбранной группы генов [95]. Основной проблемой РНК-секвенирования являются возможные ошибки, возникающие в процессе реакции обратной транскрипции, трудоемкость процедуры анализа математической обработки результатов и трудности выбора референсного генома для нормировки результатов. Эффективность секвенирования длинных РНК-транскриптов с поли-А-концом может снижаться в зависимости от удаленности гена от полинуклеотидной последовательности, что приводит к заниженным результатам и не позволяет определять слабо экспрессирующиеся гены.

В настоящее время появились технологии мономолекулярного прямого секвенирования РНК (Direct RNA Sequencing – DRSTM), развиваемые компанией Helicos [98]. Этот метод предполагает секвенирование РНК с использованием массово-параллельных технологий без дополнительной модификации образца в реакциях обратной транскрипции, лигирования, амплификации и др.

С помощью РНК-секвенирования была изучена экспрессия генов карбапенемаз KPC-2 и NDM-1 у гипервирулентных

Таблица. Молекулярно-генетические методы изучения экспрессии генов антибиотикорезистентности

Метод	Объекты и цель исследования	Полученные результаты	Ссылка
ПЦР в режиме реального времени	Оценивали измерение экспрессии генов карбапенемазы NDM и эффлюксных насосов MexAB-OprM у штаммов <i>P. aeruginosa</i> , содержащих названные генетические детерминанты в разных сочетаниях, при культивировании в присутствии меропенема (1 мг/мл). РНК выделяли из клеток каждые 45 мин в течение 6 ч	Показано, что эффлюксные насосы первыми реагируют на воздействие меропенема и обеспечивают выживание бактерий в присутствии меропенема	Choudhury, 2016 [100]
	Изучали экспрессию хромосомного гена <i>ampC</i> в клинических штаммах <i>E. coli</i>	Уровень экспрессии гена был увеличен в штаммах, содержащих мутации в промоторе гена <i>AmpC</i> , и умеренно увеличивался при наличии мутации в области Pribnow box гена <i>AmpC</i>	Coverc, 2003 [107]
	Были изучены штаммы <i>K. pneumoniae</i> с делецией размером 30 п.н., расположенной ниже промотора гена <i>blaSHV-1</i>	Обнаруженная делеция вызывала 15-кратное увеличение экспрессии гена бета-лактамазы <i>SHV-1</i> по сравнению с обычным промотором	Coverc, 2006 [108]
	Изучали ответ клеток штамма <i>E. coli</i> , продуцирующего бета-лактамазу CTX-M-1, на действие цефотаксима в концентрациях 0–512 мг/л в зависимости от фазы роста культуры, концентрации антибиотика и локализации гена	Экспрессия гена <i>blaCTX-M-1</i> увеличивалась при увеличении концентрации антибиотика. При хромосомной локализации гена уровень экспрессии бета-лактамазы был повышен по сравнению с таковым при плазмидной локализации	Kjeldsen, 2015 [85]
	Изучали формирование множественной лекарственной устойчивости у <i>A. baumannii</i> при пассировании на имипенеме. Всего было изучено 18 штаммов, включая 12 мутантных, полученных из чувствительных штаммов	Показаны различия в уровнях экспрессии генов <i>blaOXA-51</i> , <i>ampC</i> и эффлюксных насосов у трех мутантных штаммов. Установлено, что имипенем индуцирует формирование множественной лекарственной устойчивости у штаммов <i>A. baumannii</i>	Kuo, 2012 [86]
	Изучали механизм устойчивости к имипенему у штаммов <i>A. baumannii</i> , имеющих инсерционную вставку ISAb1 перед геном бета-лактамазы OXA-95	Экспрессия гена <i>blaOXA-95</i> увеличивалась в 200 раз при культивировании штамма в присутствии 0,5 мг/л имипенема по сравнению с уровнем экспрессии гена в отсутствие антибиотика	Kuo, 2014 [80]
	Определяли транскрипционный ответ у 169 штаммов <i>E. coli</i> , несущих нескольких генов бета-лактамаз, на воздействие цефалоспориновых антибиотиков	Ген <i>blaSHV-148</i> транскрибировался на базальном уровне в отсутствие антибиотического стресса. Экспрессия генов <i>blaCTX-M</i> и <i>blaSHV-148</i> увеличивалась в присутствии цефтриаксона; гена <i>blaPER-1</i> – в присутствии цефтазидима	Maurya, 2016 [87]
	Изучали связь гиперэкспрессии гена <i>ampC</i> в штаммах <i>E. coli</i> и механизм их устойчивости к цефалоспорином на выборке из 49 изолятов	Не было обнаружено связи между устойчивостью штаммов к цефокситину и гиперэкспрессией хромосомного гена бета-лактамазы <i>AmpC</i>	Paltansing, 2015 [109]
	Из 900 изолятов грамотрицательных бактерий (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>Acinetobacter</i> spp.) с помощью метода Carba NP были отобраны карбапенемрезистентные, несущие гены бета-лактамаз NDM-1 и NDM-5	Показано повышение экспрессии генов <i>blaNDM-1</i> и <i>blaNDM-5</i> при культивировании клеток в присутствии карбапенемов – имипенема, меропенема и эртапенема	Paul, 2017 [101]

РНК-секвенирование	Изучали экспрессию генов в гипервирулентном штамме <i>K. pneumoniae</i> , содержащем плазмиду p24835-NDM5 с геном карбапенемазы NDM-5	У 683 генов, отвечающих за метаболизм углеводов, биосинтез капсул и вирулентность, зафиксирована дифференциальная экспрессия: у 107 генов отмечено увеличение экспрессии, а у 576 – снижение	Long, 2019 [97]
	Изучали экспрессию генов при воздействии имипенема на штамм <i>E. coli</i> , в который была трансформирована плаزمиды из клинического штамма <i>K. pneumoniae</i> , содержащая гены антибиотикорезистентности	Наиболее экспрессируемы были гены, отвечающие за антибиотикорезистентность (<i>blaKPC-2</i> , <i>blaTEM</i> , <i>aph(3')-I</i>); наибольшее увеличение экспрессии было отмечено для хромосомных генов, отвечающих за окислительный стресс	Jousset, 2018 [96]
Биочипы	Изучали изменение экспрессии генов в биопленках <i>P. aeruginosa</i> под действием субингибирующих концентраций имипенема на биочипах высокой плотности	Идентифицированы 34 гена, экспрессия которых в биопленке снижалась или увеличивалась более чем в 5 раз после воздействия имипенема по сравнению с экспрессией в отсутствие антибиотика. Наиболее сильно увеличивалась экспрессия хромосомного гена <i>ampC</i> и генов, кодирующих биосинтез альгината	Bagge, 2004 [110]
	Изучали транскрипционный ответ бактерий <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>in vivo</i> в легких инфицированных мышей под действием цефтазидима по сравнению с таковым <i>in vitro</i>	Идентифицировано 1688 транскрипционно-активных бактериальных генов, уникальных для лечения <i>in vivo</i> , из них 591 генов дифференциально экспрессировались при лечении цефтазидимом, в том числе гены пенициллинсвязывающих белков и бета-лактамаз (<i>penA</i>). <i>In vitro</i> только 186 генов по-разному реагировали на обработку цефтазидимом	Cummings, 2017 [111]
Электрофоретическое определение ПЦР-продуктов	Изучали синергетическое действие байкалеина и цефотаксима против <i>K. pneumoniae</i>	Исследование показало, что байкалеин проявляет синергетическую активность в сочетании с цефотаксимом против некоторых штаммов <i>K. pneumoniae</i> , что связано с ингибированием экспрессии мРНК гена <i>blaCTX-M-1</i>	Cai, 2016 [112]
	Изучали причины отсутствия экспрессии генов антибиотикорезистентности <i>blaOXA-2</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> и <i>tetA</i> , находящихся под интактными промоторами штаммов <i>E. coli</i> на плазмиде pVE46	Показана обратимость процесса отсутствия экспрессии при перемещении плазмиды в другой штамм. Высказано предположение о существовании неизвестной формы контроля транскрипции, которая перекрывает стандартные транскрипционные сигналы, чтобы выключить экспрессию генов. Эти данные свидетельствуют о том, что неэкспрессируемые гены резистентности могут встречаться в дикой природе и, следовательно, иметь клинические последствия	Enne, 2006 [92]
	Изучали экспрессию гена <i>blaSHV</i> у изолятов <i>K. pneumoniae</i> , чувствительных к ампициллину	Показано, что чувствительные штаммы могут содержать неэкспрессирующиеся (молчащие) гены бета-лактамаз	Fu, 2007 [90]
Секвенирование ПЦР-продуктов	Оценивали влияние акрифлавина на перемещение инсерционной последовательности ISAba1 в клинических изолятах <i>A. baumannii</i> с акцентом на изменение уровней экспрессии генов <i>blaADC</i> и <i>blaOXA-51</i>	Зафиксировано встраивание ISAba1 выше генов бета-лактамаз, что вызывало увеличение экспрессии этих генов. Утрата ISAba1 из области выше генов <i>blaADC</i> и <i>blaOXA-51</i> приводила к значительному снижению экспрессии первого гена и, в меньшей степени, второго. Сделан вывод, что перемещение IS-элемента ISAba1 в хромосоме <i>A. baumannii</i> может быть важным регуляторным механизмом, используемым бактерией в определенных стрессовых условиях для повышения экспрессии генов антибиотикорезистентности	Lopes, 2011 [77]
	Изучали 224 чувствительных к антибиотикам штаммов <i>K. pneumoniae</i> на наличие неэкспрессирующихся генов антибиотикорезистентности	Неэкспрессирующийся ген бета-лактамазы SHV, находящийся под интактным промотором, был обнаружен в 5 чувствительных к бета-лактамам штаммах	Li, 2014 [21]

штаммов *K. pneumoniae* в присутствии карбапенема имипенема [96, 97].

ПЦР в режиме реального времени

Наиболее часто при изучении экспрессии генов антибиотикорезистентности используется метод ПЦР в режиме реального времени, который позволяет детектировать накопление продукта амплификации по активности флуоресцентных меток. Для мониторинга флуоресценции во время реакции используют неспецифические красители, включая SYBR Green или Eva Green, а также специфические последовательности праймеров, содержащие флуоресцентные красители. Количественную оценку проводят по определению порогового цикла (Ct) – количества циклов реакции амплификации, которое требуется для получения флуоресцентного сигнала, значимо отличающегося от фонового [99]. Метод характеризуется меньшим коэффициентом вариации

по сравнению с оценкой по конечной точке, которая принята в ПЦР классического формата. Основным отличительным преимуществом ПЦР в режиме реального времени является простота выполнения, отсутствие дополнительных манипуляций с ампликоном после окончания реакции, возможность совмещения амплификации с реакцией обратной транскрипции, однако эффективность определения мРНК при этом снижается. Несмотря на привлекательность данного метода, он обладает рядом сложностей в своей реализации: низкая воспроизводимость результатов при низких концентрациях ДНК-матрицы, фоновая флуоресценция образца, вследствие чего возникают трудности определения слабо экспрессирующихся генов. Специфичность амплифицированного ПЦР-продукта при использовании интеркалирующих красителей, таких как SYBR Green, подтверждают по наличию только одного пика его кривой плавления. Данный

метод позволяет выявлять различия в экспрессии генов на уровне 20–30%. Данный метод был использован во многих работах по изучению изменений уровней экспрессии генов бета-лактамаз NDM-, CTX-M-, SHV-типов [85, 87, 100, 101].

Гибридизационный анализ на ДНК-чипах

ДНК-чипы представляют собой носители небольшой площади, на которые нанесены в определенном порядке короткие олигонуклеотидные зонды, комплементарные участкам последовательностей определяемых генов [102, 103]. Существуют различные технологии идентификации нуклеотидных последовательностей, наиболее распространенной является аллель-специфическая гибридизация исследуемой ДНК-мишени с одним или несколькими иммобилизованными зондами. Данная технология с использованием ДНК-чипов высокой плотности, включающих десятки тысяч олигонуклеотидных зондов, показала свою эффективность в профилировании мРНК, мониторинге экспрессии большого количества генов и даже целых геномов [103, 104]. Впервые технология ДНК-чипов высокой плотности с использованием коротких олигонуклеотидных зондов была применена компанией Affymetrix. Она была основана на одновременном тестировании двух образцов, один из которых является образцом сравнения. Для сравнительного анализа использовали два типа флуоресцентных красителей, что позволяло определить соотношение уровней мРНК у двух образцов одновременно. Для повышения специфичности анализа при идентификации генов использовали до 10 различных олигонуклеотидных зондов. Результатом высокопроизводительного сравнительного анализа на ДНК-чипах высокой плотности является определение направления изменения экспрессии наборов генов (увеличение или подавление экспрессии) в тех или иных условиях. Результат не является количественным. ДНК-чипы применяются также для изучения механизмов действия лекарственных препаратов на клетки и изменения экспрессии определенных генов [103].

Ограничением метода гибридизационного анализа на ДНК-чипах является достаточно узкий динамический диапазон обнаружения, находящийся в интервале двух или трех порядков величины концентраций [102]. Данный метод, как и рассмотренные ранее, требует оптимизации нормировки экспериментальных данных для корректного сравнения результатов, полученных при тестировании разных образцов. Кроме того, неспецифическая гибридизация близкородственных генов может приводить к высоким фоновым значениям и снижать динамический диапазон регистрируемых сигналов. Однако возможность проведения мультиплексного анализа большого количества генов с полной автоматизацией процесса является явным преимуществом данной технологии.

Для определения экспрессии единичных генов возможно использование ДНК-чипов низкой плотности, содержащих до нескольких десятков специфических олигонуклеотидных зондов. Такие биочипы разработаны для идентификации генов бета-лактамаз [105, 106], однако для количественного определения экспрессии генов пока не применялись.

Заключение

Устойчивость бактерий к антибиотикам эволюционно возникла как защитная система от собственных и чужих антибактериальных соединений. Благодаря горизонтальному

переносу генов бактерии приобретали новые свойства и развивали свой потенциал устойчивости к внешним воздействиям. Встраивание генов устойчивости в хромосомы и плазмиды опосредовано участием мобильных и интегративных элементов. Активное применение антибиотиков человеком для лечения и профилактики инфекционных заболеваний человека и животных привело к экспоненциальному росту резистентности у бактерий, сочетанию различных механизмов резистентности и появлению множественной, экстремальной и панрезистентности. Появление патогенов, вооруженных множественными механизмами антибиотикорезистентности, существенно осложнило выбор адекватной антимикробной терапии. Понимание этих механизмов важно для поиска новых способов преодоления резистентности и повышения эффективности уже используемых в настоящее время антибиотиков.

При изучении мультирезистентных бактерий основными являются вопросы, все ли генетические детерминанты резистентности экспрессируются, какие механизмы использует для этого бактериальная клетка, как можно предотвратить индукцию генов резистентности. Для решения этих задач разрабатываются количественные методы определения экспрессии генов. Из-за многообразия и сложности механизмов резистентности они должны характеризоваться достаточно высокой мультиплексностью и производительностью. К наиболее высокопроизводительным относятся РНК-секвенирование и ДНК-чипы; метод ПЦР в режиме реального времени относится к среднепроизводительным. Несмотря на многообразие уже разработанных методов, существуют технические проблемы, не до конца решенные к настоящему времени: нестабильность образцов РНК; наличие в образцах РНК остаточных количеств ДНК; необходимость выбора адекватных референсных генов для нормирования результатов; необходимость оценки погрешности при количественных измерениях с учетом сложности пробоподготовки для анализа РНК-транскриптов; трудоемкость процесса; необходимость адаптации методов для применения в клинической практике. Поэтому актуальной остается разработка новых подходов для количественного определения экспрессирующихся генов резистентности в клетках бактерий – возбудителей инфекций.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант 19-34-50071), госзадания МГУ им. М.В.Ломоносова (AAAA-A16-116052010081-5) и отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг.

Financial support

This work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Grant 19-34-50071), the state order of the Moscow State University. MV Lomonosov (AAAA-A16-116052010081-5) and the sectoral research program of Rosпотребнадзор for 2016–2020.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература/References

- Geetanjali JP. Antibiotic productions by rhizospheric soil microflora. A review. *Int J Pharm Sci Res.* 2016;7:4304-4314.
- Watkins RR, Bonomo RA. Overview: global and local impact of antibiotic resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):313-322. DOI: 10.1016/j.idc.2016.02.001
- Smith RA, M'ikanatha NM, Read AF. Antibiotic resistance: a primer and call to action. *Health Commun.* 2015;30(3):309-14.
- Hofer U. Stop that plasmid. *Nature Reviews Microbiology.* 2020;18:264-265. DOI: 10.1038/s41579-020-0349-4
- Von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolfs PFG. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol.* 2016;7:173. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173
- Tyrrell C, Burgess CM, Brennan FP, Walsh F. Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(1):477-486. DOI: 10.1042/BST20180552
- Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. Antibiotic resistance genes in waste water. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):220-228. DOI: 10.1016/j.tim.2017.09.005
- Hiltunen T, Virta M, Laine AL. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1712):20160039. DOI: 10.1098/rstb.2016.0039
- Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors, influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(1):fux053.
- Rodríguez-Martínez J, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4783-8. DOI: 10.1128/AAC.00574-09
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:593-656. DOI: 10.1128/mmb.67.4.593-656.2003
- Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases.* 2019;69(7):521-528. DOI: 10.1093/cid/ciz824
- Moya B, Beceiro A, Cabot G. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanism, penicillin-binding protein profiles and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4771-4778.
- Egorov AM, Ulyashova MM, Rubtsova MY. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta naturae.* 2018;10(4):33-48.
- Andersson D, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology.* 2014;12(7):465-478.
- Li L, Ge H, Gu D, Meng H, Li Y, Jia M, Zheng C, Zhou X. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research.* 2018;215:126-129.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol. Infect.* 2012;18(3):268-281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Weldhagen G. Integrons and β -lactamases – a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2004;23:556-562.
- Brolund A. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol.* 2014;4:24555.
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:487-9. DOI: 10.1093/jac/dks426.
- Li X, Yao Z, Yuan L, Qi W, Shuchang A, Jichao C, et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* strains harboring inactive extended-spectrum beta-lactamase antibiotic-resistance genes. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(17):3051-7.
- Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):1-20.
- Bonomo RA. β -lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(1):1-16.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289:321-31.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-76.
- Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews.* 2020;33(2):1-37.
- Wilson H, Török ME. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microbial Genomics.* 2018;4:1-14.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-1161.
- Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Hackel M, Rabine S, de Jonge BLM, Bouchillon SK, et al. Global dissemination of blaKPC into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and *in vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:4490-4500.
- Carpenter J, Neidig N, Campbell A, Thornsberry T, Truex T, Fortney T, et al. Activity of imipenem/relebactam against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high colistin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:3260-3263. DOI: 10.1093/jac/dkz354
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:470-482.
- Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3:15-21. DOI: 10.1177/2049936115621709
- Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 2018;50:327-33. DOI: 10.1016/j.ram.2017.10.006
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:15-22.
- Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, et al. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2008;54:101-106.
- Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:587-604. DOI: 10.1007/s10096-017-3112-7
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:891-897.
- Lauretti L, Riccio M, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1584-1590.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;60:5046-5054.
- Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, et al. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:1067-1078. DOI: 10.1128/AAC.02379-15.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:355-362.

42. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:821-830. DOI: 10.1111/1469-0691.12719
43. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2019/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2019>
44. Chakraborty AK, Maity M, Patra S, Mukherjee S, Mondal T. Complexity, Heterogeneity and Mutational Analysis of Antibiotic Inactivating Acetyl Transferases in MDR Conjugative Plasmids Conferring Multi-Resistance. *RR: J Microbiol Biotechnol.* 2017;6(2):28-44.
45. Carvajal LP, Rincon S, Echeverri AM, Porras J, Rios R, Ordoñez KM, et al. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal β -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5):e02511-19. DOI: 10.1128/AAC.02511-19
46. Silva V, Hermenegildo S, Ferreira C, Manaia CM, Capita R, et al. Genetic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Human Bloodstream Infections: Detection of MLSB Resistance. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(7):375. DOI: 10.3390/antibiotics9070375
47. Llarrull LI, Toth M, Champion MM, Mobashery S. Activation of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, its proteolytic processing, and recovery from induction of resistance. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38148-38158.
48. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science.* 2001;291(5510):1962-1965. DOI: 10.1126/science.1055144
49. Hao H, Dai M, Wang Y, Huang L, Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2012;7(11):1315-1329. DOI: 10.2217/fmb.12.107
50. Jacobs C, Frère JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* 1997;88(6):823-832.
51. Fisher JF, Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Chem.* 2014;56:41-48.
52. Dhar S, Kumari H, Balasubramanian D, Mathee K. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* – their role in the development of resistance. *J Med Microbiol.* 2018;67(1):1-21. DOI: 10.1099/jmm.0.000636
53. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4:128. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00128
54. Caille O, Zincke D, Merighi M, Balasubramanian D, Kumari H, Kong KF, et al. Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* global regulator AmpR. *J Bacteriol.* 2014;196(22):3890-3902. DOI: 10.1128/JB.01997-14
55. Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del Puerto A, Koh CL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4567-4575. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4567-4575.2005
56. Balasubramanian D, Schnepfer L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One.* 2012;7(3):e34067. doi: 10.1371/journal.pone.0034067
57. Zamorano L, Reeve TM, Juan C, Moyá B, Cabot G, Voadlo DJ, et al. AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):1990-1996. DOI: 10.1128/AAC.01688-10.
58. Asgarali A, Stubbs KA, Oliver A, Voadlo DJ, Mark BL. Inactivation of the glycoside hydrolase NagZ attenuates antipseudomonal beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2274-2282.
59. Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, et al. NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3557-3563. DOI: 10.1128/AAC.00385-10
60. Babouee Flury B, Ellington MJ, Hopkins KL, Turton JF, Doumith M, Woodford N. The differential importance of mutations within AmpD in cephalosporin resistance of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(5):555-558. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.021
61. Schmidtke AJ, Hanson ND. Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):3922-3927.
62. Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1780-1787. DOI: 10.1128/AAC.50.5.1780-1787.2006
63. Moya B, Juan C, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3694-3700. DOI: 10.1128/AAC.00172-08
64. Lingzhi L, Haojie G, Dan G, Hongmei M, Yang L, et al. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiol Res.* 2018;215:126-129. DOI: 10.1016/j.micres.2018.07.005
65. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(6):781-815.
66. Buckler DR, Anand GS, Stock AM. Response-regulator phosphorylation and activation: a two-way street? *Trends Microbiol.* 2000;8(4):153-156.
67. Niumsup P, Simm AM, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM, Avison MB. Genetic linkage of the penicillinase gene, *amp*, and *blrAB*, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(6):1351-1358.
68. Avison MB, Horton RE, Walsh TR, Bennett PM. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem.* 2001;276(29):26955-26961.
69. Zamorano L, Moyá B, Juan C, Mulet X, Blázquez J, Oliver A. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5084-5095. DOI: 10.1128/AAC.02556-14
70. West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):369-376.
71. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A. β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* 2009 Mar;5(3):e1000353. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000353
72. Tayler AE, Ayala JA, Niumsup P, et al. Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology (Reading).* 2010;156(Pt 8):2327-2335.
73. Avison MB, Niumsup P, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM. Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(2):197-202.
74. Li L, Wang Q, Zhang H, Yang M, Khan MI, Zhou X. Sensor histidine kinase is a β -lactam receptor and induces resistance to β -lactam antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(6):1648-1653.
75. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 2018;31(4):e00088-17.
76. Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Virdi JS. Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2018;51:167-176. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004

77. Lopes BS, Hamouda J, Amyes F. Effect of frameshift mutagen acriflavine on control of resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*. 2011;60:211-215.
78. Al-Hassan L, Opazo A, Lopes BS, Mahallawy HE, Amyes SGB. Variations in IS6 promoters alter the expression of carbapenem resistance in related strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2015;3:5-8. DOI: 10.1016/j.jgar.2014.10.003
79. Lopes BS, Gallego L, Amyes SGB. Multi-drug resistance profiles and genetic features of *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(4):323-328. DOI: 10.3855/jidc.2711
80. Kuo HY, Chang KC, Liu CC, Tang CY, Peng JH, Lu CW, et al. Insertion sequence transposition determines imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*. 2014 Oct;20(5):410-5. DOI: 10.1089/mdr.2014.0004
81. Nicolas E, Lambin M, Dandoy D, Galloy C, Nguyen N, Oger CA, Hallet B. The Tn3-family of replicative transposons. *Microbiol Spectr*. 2015;3:MDNA3-0060-2014.
82. Sarno R, McGillivray G, Sherratt DJ, Actis LA, Tolmasky ME. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3422-3427.
83. Partridge SR. What's in a name? ISSwi1 corresponds to transposons related to Tn2 and Tn3. *mBio*. 2015;6:e01344-15. DOI: 10.1128/mBio.01344-15
84. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in *blaKPC* gene expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4753-4759.
85. Kjeldsen TSB, Overgaard M, Nielsen SS, et al. CTX-M-1 β -lactamase expression in *Escherichia coli* in dependent on cefotaxime concentration, growth phase and gene location. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:62-70. DOI: 10.1093/jac/dku332
86. Kuo HY, Chang KC, Kuo JW, Yueh HW, Liou ML. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:33-38. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.08.016
87. Maurya AP, Chanda DD, Bora D, Talukdar AD, Chakravarty A, Bhattacharjee A. Transcriptional response of multiple ESBL gene within *Escherichia coli* under oxymino-cephalosporin stress. *Microbial Drug Resistance*. 2016;0:1-6.
88. Uddin MJ, Ahm J. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*. 2017;65(6):462-468. DOI: 10.1111/lam.12808
89. Zhao JF, Wang Q, Ge YM, Tan PL, Chen YM, Yan J. Distribution of β -lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Zhejiang province, China, and regulation of gene expression. *Arch Biol Sci*. 2017;69(3):399-407.
90. Fu Y, Zhang F, Zhang W, Chen X, Zhao Y, et al. Differential expression of *bla(SHV)* related to susceptibility to ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(3):344-7.
91. Zhang Z, Zhai Y, Li D, Wang Z, Wang J, Chen Y, et al. Characterization of unexpressed extended-spectrum beta-lactamase genes in antibiotic-sensitive *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microb Drug Resist*. 2018;24(6):799-806.
92. Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3003-10.
93. Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2007;17:69-73.
94. Fan HC, Fu GK, Fodor SPA. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347(6222):1258367.
95. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-656. DOI: 10.1038/s41576-019-0150-2
96. Jousset AB, Chupin IR, Takissian J, Glaser P, Bonnin RA, Naas T. Transcriptional landscape of a *bla* KPC-2 plasmid and response to imipenem exposure in *Escherichia coli* TOP10. *Front Microbiol*. 2018;9:2929. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02929
97. Long D, Zhu LI, Du F, Xiang T, Wan LG, Wei D, et al. Phenotypical profile and global transcriptomic profile of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to carbapenemase-encoding plasmid acquisition. *BMC Genomics*. 2019;20:480.
98. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifenger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. *Nature*. 2009;461(7265):814-818.
99. Shakeel M, Rodriguez A, Tahir UB, Jin F. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects. *Biotechnol Lett*. 2018;40(2):227-236. DOI: 10.1007/s10529-017-2465-4
100. Choudhury D, Paul D, Ghosh AS, Talukdar AD, Choudhury MD, Maurya AP, et al. Effect of single-dose carbapenem exposure on transcriptional expression of *blaNDV-1* and *mexA* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;7:72-77. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.07.015
101. Paul D, Garg A, Bhattacharjee A. Occurrence of *blaNDM-1* and *blaNDM-5* in a tertiary referral hospital of north India. *Microbial Drug Resistance*. 2017 Oct;23(7):815-821. DOI: 10.1089/mdr.2016.0124
102. Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to gene expression analysis. *Methods Mol Biol*. 2016;1434:29-43. DOI: 10.1007/978-1-4939-3652-6_3
103. Katagiri F, Minnesota SP. Overview of mRNA expression profiling using DNA microarrays. *Curr Protoc Mol Biol*. 2009;22:uit 22.4.
104. Domingues A, Munoz E, Lopez MC, Martinez JP, Vinas M. Transcriptomics as a tool to discover new antibacterial targets. *Biotechnol Lett*. 2017;39(6):819-828. DOI: 10.1007/s10529-017-2319-0
105. Rubtsova MYu, Ulyashova MM, Edelstein MV, Egorov AM. Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum β -lactamases. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;26:1252-1260.
106. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of DNA microarray, the check-points ESBL/KPC Array, for rapid detection of TEM, SHV and CTX_M Extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3086-3092.
107. Coverc S, Caroff N, Espaze E, Marrailac J, Drugeon H, Reynaud A. Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;228:187-191.
108. Coverc S, Caroff N, Cosano D, Dauvergne S, Drugeon H, Reynaud A. Increased resistance to β -lactams in a *Klebsiella pneumoniae* strain: role of deletion downstream of the Pribnow box in the *blaSHV-1* promoter. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:308-312.
109. Paltansing S, Kraakman M, Boxtel R, Kors I, Wessels E, Goessens W, et al. Increased expression levels of chromosomal AmpC β -lactamase in clinical *Escherichia coli* isolates and their effect on susceptibility to Extended-spectrum cephalosporins. *Microbial Drug Resistance*. 2015 Feb;21(1):7-16. DOI: 10.1089/mdr.2014.0108
110. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg E P, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4):1175-1187.
111. Cummings JE, Slayden RA. Transient *in vivo* resistance mechanisms of *Burkholderia pseudomallei* to ceftazidime and molecular markers for monitoring treatment response. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;12,11(1):e0005209.
112. Cai W, Fu Y, Zhang W, Chen X, Zhao J, et al. Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against *Klebsiella pneumoniae* through inhibiting CTX-M-1 gene expression. *BMC Microbiology*. 2016;16:181. DOI: 10.1186/s12866-016-0797-1
113. Lautenschlager N, Popp PF, Mascher T. Development of a novel heterologous β -lactam-specific whole-cell biosensor in *Bacillus subtilis*. *J Biol Eng*. 2020;14:21. DOI: 10.1186/s13036-020-00243-4
114. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610. DOI: 10.1128/CMR.00040-09
115. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):79-114. DOI: 10.1128/CMR.00015-06.

Информация об авторах:

Филиппова Анна Андреевна, аспирантка кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»

Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Телефон: (495)939-2968

E-mail: iiffii@mail.ru

Рубцова Майя Юрьевна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»

Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Телефон: (495) 939-2727

E-mail: mrubtsova@gmail.com

Уляшова Мария Морисовна, кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»

Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Телефон: (495) 939-2968

E-mail: mmulyashova@gmail.com

Information about authors:

Anna A. Filippova, PhD student, Div. Chem. Enzymology, Dept. Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

Address: 1/3 Leninskie Gori, Moscow, 119991, Russian Federation

Phone: (495) 939-2968

E-mail: iiffii@mail.ru

Maya Yu. Rubtsova, PhD (Chemistry), leading researcher, Div. Chem. Enzymology, Dept. Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

Address: 1/3 Leninskie Gori, Moscow, 119991, Russian Federation

Phone: (495) 939-2727

E-mail: mrubtsova@gmail.com

Mariya M. Ulyashova, Cand. Sci. (Chemistry), researcher, Div. Chem. Enzymology, Dept. Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

Address: 1/3 Leninskie Gori, Moscow, 119991, Russian Federation

Phone: (495) 939-2968

E-mail: mmulyashova@gmail.com

НОВОСТИ НАУКИ

Эволюция микробных заболеваний

Геномы микробов принципиально отличаются от геномов многих животных и растений. Обычно 90% их генома кодирует белки или структурную РНК, тогда как только 1,1% генома человека представляет собой кодирующую последовательность.

По состоянию на 2011 г. было секвенировано более 1500 бактериальных и более 100 архейных геномов.

Развитие микробных заболеваний может происходить быстро и приводить к появлению различных штаммов одного и того же вида. Например, существуют как патогенные, так и непатогенные штаммы *Escherichia coli*. Штаммы могут различаться на 36%, т.е. больше, чем некоторые виды животных отличаются друг от друга.

Сравнительно быстрая и эффективная эволюция микробов возможна благодаря обычно небольшому размеру генома, скорости мутаций и горизонтальной передаче генов.

Хотя эволюция болезнетворных микробов обычно направлена на повышение их патогенности, патогенность может быть неожиданной. Потеря генов и сокращение генома произошли у нескольких специфичных для человека патогенов, таких как *Yersinia pestis*. У возбудителя чумы 3,7% генома неактивны. Другой пример – *Mycobacterium leprae*, вызывающая проказу, у которой примерно половина генома состоит из неактивных и фрагментированных генов. У ряда микробов локусы CRISPR работают как форма адаптивного иммунитета. Это позволяет микробам сохраняться.

Развитие новых микробных заболеваний обычно происходит двумя способами: смена хозяев и увеличение круга хозяев. Первый относится к микробам, которые эволюционируют с целью размножения в новом хозяине, второй относится к увеличению числа видов хозяев, которые микроб может заразить.

Анализ штаммов вида *Y. pestis* выявил его происхождение из Китая, с линиями, специфичными для стран и регионов, которые развиваются по мере распространения по миру. Первоначальный вид *Y. pestis* возник в результате редукции генома и потери генов от гораздо более генетически разнообразного предка.

В некоторых случаях можно спрогнозировать развитие микробных заболеваний, чтобы лучше управлять вспышками. Вирус гриппа следует модели прерывистого равновесия эволюции, что означает, что есть периоды стабильности, за которыми следуют периоды быстрой эволюции. Кроме того, отслеживание эволюционной истории штаммов показало, что штаммы, скорее всего, возникают в Юго-Восточной Азии, а не сохраняются локально в периоды стабильности. Знание этого может помочь в борьбе с распространением вируса и в быстрой разработке новых вакцин для борьбы с новыми штаммами.



*Understanding the Evolution of Microbial Disease [Electronic resource].
News-Medical.net. 2020.*

URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Understanding-the-Evolution-of-Microbial-Disease.aspx>

Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 2

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

Профилактика и лечение геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС), вызываемых шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli* (STEC), продолжают оставаться одной из проблем общественного здравоохранения. Основная причина проблемы – отсутствие вакцинных препаратов и противопоказания для применения этиотропных антибактериальных средств лечения данной инфекции. Перспективное научное направление по созданию специфических средств защиты населения от STEC-инфекции – это разработка субъединичных рекомбинантных вакцин. Как показывает анализ результатов экспериментальных исследований, представленных в данном обзоре, эффективные субъединичные вакцины против STEC-инфекции можно создать на основе известных для возбудителей ГК и ГУС иммуногенных детерминант – протеинов EspA, EspB, Tir, интимина, а также антигена H7 O157:H7 и нетоксичных протеинов А и В субъединиц шига-токсинов Stx1 и Stx2. Используя указанные эпитопы, конструируют три типа субъединичных вакцин: антибактериальные, защищающие макроорганизм от системной интоксикации шига-токсинами, и вакцины, индуцирующие одновременно формирование антибактериального и антитоксического иммунитета. Поскольку перечисленные выше эпитопы обладают слабой иммуногенностью, для ее увеличения, как правило, конструируют сложные химерные антигенные структуры, содержащие белки-индукторы, существенно увеличивающие иммунный ответ на целевые специфические эпитопы. Для увеличения иммуногенности эпитопов STEC также широко используют минеральные адъюванты. Все три типа создаваемых кандидатных субъединичных вакцин при подкожной, внутримышечной и интраназальной аппликации антигенов индуцируют у животных образование специфических анти-

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 2. Бактериология. 2020; 5(3): 47–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-47-59

Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 2

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

Prevention and treatment of hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS) caused by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) continues to be a public health concern. The main reason for the problem is the lack of vaccines and lack of evidence for using of antibacterial etiotropic drugs to treat this infection. A promising scientific approach to create specific agents against STEC infection is the development of subunit recombinant vaccines. The analysis of experimental studies presented in this review shows that effective subunit vaccines against STEC infection can be created on the basis of known immunogenic determinants of HC and HUS causative agents – EspA, EspB, and Tir proteins, intimin, as well as H7 antigen of *E. coli* O157:H7 and nontoxic proteins of Shiga toxins Stx1 and Stx2 A and B subunits. Using these epitopes, three types of subunit vaccines are designed: antibacterial vaccine, vaccine protecting the macroorganism from systemic intoxication caused by Shiga toxins, and vaccines that simultaneously induce the antibacterial and antitoxic immunity. Since the epitopes listed above are weak immunogenic, to increase their immunogenicity, complex chimeric antigenic structures containing protein inducers are constructed that significantly increase the immune response to target specific epitopes. Mineral adjuvants are also widely used to increase the immunogenicity of STEC epitopes. All three types of created candidate subunit vaccines, at

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 21.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 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, 142279 Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 21.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

subcutaneous, intramuscular and intranasal application induce production of specific IgG and secretory IgA antibodies in animals and protect them from the infection caused by the STEC strains.

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 2. Bacteriology. 2020; 5(3): 47–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-47-59

В предыдущей части обзора нами были рассмотрены все основные типы кандидатных вакцин, за исключением субъединичных рекомбинантных, создаваемых в настоящее время против STEC-инфекции человека [1]. Данное сообщение посвящено анализу субъединичных рекомбинантных вакцин, как одному из наиболее популярных и привлекательных на сегодня научных направлений по конструированию специфических препаратов против геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС), вызываемых у человека шига-токсин-продуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC).

При конструировании кандидатных субъединичных вакцин используют методы генетической инженерии, которые позволяют в сравнительно короткие сроки клонировать гены протективных антигенов и, используя экспрессирующие векторы, создавать штаммы-продуценты целевых антигенов, нарабатывать и испытывать антигены в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Методы генетической инженерии позволяют также создавать вакцинные препараты на основе не только отдельных иммуногенных детерминант (эпитопов), но и сложных слитных (химерных) белковых антигенов, совмещающих в себе несколько протективных эпитопов, обеспечивающих защиту макроорганизма на основных стадиях патогенеза STEC-инфекции: на стадии адгезии и колонизации и на стадии системной интоксикации шига-токсинами. В состав химерных белков могут быть включены, помимо специфических целевых антигенных детерминант, и белки, способные увеличивать иммунный отклик на целевые антигены, например на слабоиммуногенные А- и В-субъединицы шига-токсинов Stx1 и Stx2. Полученные генно-инженерными методами антигены позволяют исследователю испытывать их иммуногенные свойства в самых разных комбинациях и выбирать наилучшие из них для конструирования субъединичных вакцин. Для конструирования кандидатных вакцин экспериментаторы чаще всего используют хорошо изученные иммуногенные детерминанты энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC) – интимин, EspA, EspB, Tir, детоксицированные А- и нетоксичные белки В-субъединиц шига-токсинов Stx1 и Stx2. Испытываются также и вновь открываемые у различных патогенов *E. coli* кандидатные протективные антигены.

Ниже мы представляем краткий анализ некоторых интересных, на наш взгляд, экспериментальных работ по изучению различных по рецептурному составу кандидатных субъединичных вакцин против STEC(ЕHEC)-патогенов, разработанных в последние два десятилетия.

Субъединичные вакцины

Иммуногенные и протективные свойства субъединичных (рекомбинантных) вакцин исследователи испытывали, как правило, либо на лабораторных моделях (чаще на мышах линии BALB/c), либо на сельскохозяйственных животных.

Субъединичные вакцины на основе интимина и протеинов системы III типа секреции EHEC

В 1999 г. Gansheroff et al. доказали, что только антитела к полной молекуле интимина или к его С-терминальному концу (~280 а.к.) EHEC-серотипа O157:H7 способны *in vitro* блокировать или снижать адгезию клеток гомологичного серотипа к линии эпителиальных клеток человека HEp-2 [2]. Авторы установили также, что антитела к интимину *E. coli* O157:H7 могут блокировать адгезию к HEp-2 некоторых других (но не всех) штаммов EHEC-серотипов O55:H7, O111:H11 и O157:H11. Такая избирательность антиадгезивных свойств антител к интимину *E. coli* O157:H7 зависела, как оказалось, от различия аминокислотных последовательностей С-конца интимина у испытанных гетерологичных штаммов *E. coli*. Поэтому в большинстве последующих работ исследователи чаще всего в качестве иммуногенного и протективного антигена использовали интимин-гамма (γ), ассоциированный с высокопатогенным для человека эпидемически важным штаммом EHEC-серотипа O157:H7.

Об эффективности иммуногенных и протективных свойств рекомбинантного интимина (Int 261), продуцируемого растительными клетками трансгенного табака, сообщили Judge et al., которые показали, что однократная внутрибрюшинная иммунизация мышей линии BALB/c рекомбинантным интиминном индуцировала у животных мощный сывороточный (IgG) и секреторный мукозальный (slgA) иммунный ответ [3]. Хороший мукозальный (но не сывороточный) ответ был получен также у мышей после трехкратного скормливания им трансгенных (Int 261+) клеток табака или трансгенных клеток табака вместе с протеином В-субъединицы холерного токсина в качестве адьюванта. Однако наилучший мукозальный ответ у животных был получен при однократной внутрибрюшинной иммунизации мышей препаратом Int 261 и скормливания им трансгенных (Int 261+) клеток табака и химически очищенного препарата В-субъединицы холерного токсина. Все иммунизированные рекомбинантным интиминном животные были лучше защищены от перорального заражения их штаммом *E. coli* O157:H7: концентрация и продолжительность выделения патогена с фекалиями у них были существенно меньше, чем у контрольных (неиммунизированных) мышей.

В работе Babiuk et al. мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантными белками Tir и EspA двумя способами: интраназальным и подкожным [4]. Было показано, что интраназальная иммунизация указанными протеинами совместно с адьювантами – В-субъединицей холерного токсина или олигонуклеотидом CpG – индуцировала у животных образование высоких титров специфических сывороточных IgG-антител и лишь незначительное количество slgA-антител, обнаруживаемых в фекалиях отдельных животных. Подкожная иммунизация мышей теми же антигенами вызвала у них мощный гуморальный отклик и не индуцировала

мукозального ответа. В то же время иммунизированные и интраназально, и подкожно белками Tir и EspA мыши оказались защищенными от перорального заражения штаммом *E. coli* O157:H7. У животных, иммунизированных подкожно, в фекалиях вообще не обнаруживали клеток патогена, несмотря на то, что в содержимом их кишечника отсутствовали секреторные IgA. У животных, иммунизированных интраназально, количество выделяемых в фекалиях *E. coli* O157:H7 было существенно снижено по сравнению с контрольными (неиммунизированными) животными. На основании полученных результатов авторы высказали предположение, что у мышей, иммунизированных подкожно, колонизация кишечного тракта патогеном была предотвращена за счет IgG-антител, трансдуцировавшихся в кишечную трубку из кровеносного русла животного. Авторы сделали весьма интересный вывод: для предупреждения колонизации патогеном *E. coli* O157:H7 кишечника мышей линии BALB/c не обязательно наличие в кишечном тракте секреторных IgA.

Cataldi et al. провели испытание влияния адьюванта MALP-2 (макрофаг-активирующего липопептида) на иммуногенные свойства рекомбинантного интимина-γ (Int 280) и белка EspB при интраназальной вакцинации мышей BALB/c [5]. В результате проведенных экспериментов было установлено, что адьювант MALP-2 оказывал значительный стимулирующий эффект на иммунный ответ вакцинированного животного: скорость образования и титры специфических IgG- и sIgA-антител к обоим целевым антигенам у мышей, вакцинированных вместе с адьювантом MALP-2, были существенно выше, чем у контрольных мышей, вакцинированных интимин-γ и белком EspB без адьюванта MALP-2. Важно отметить также, что интраназальная иммунизация антигенами вместе с адьювантом MALP-2 индуцировала у мышей активный мукозальный иммунный ответ: специфические sIgA против интимина и белка EspB обнаруживали как в бронхиальном лаваже (в больших титрах), так и в содержимом кишечника (в меньших титрах). Следует отметить еще один интересный факт, полученный в данной работе: у животных, иммунизированных рекомбинантным интимин-γ вместе с адьювантом MALP-2, в содержимом кишечника обнаруживали IgG-антитела, в то время как у мышей, иммунизированных без MALP-2, IgG-антитела отсутствовали. При иммунизации животных белком EspB, даже вместе с MALP-2, IgG-антитела в кишечнике не детектировали. Однако, как отмечают авторы работы, количество специфических IgG в содержимом кишечника было в 2000 раз меньше по сравнению с количеством sIgA.

Gu et al. сконструировали и испытали трехвалентный химерный (слитный) белок, состоящий из антигенных детерминант EspA, интимина и В-субъединицы шига-токсина Stx2 [6]. В опытах на мышах линии BALB/c было показано, что трехвалентный химерный антиген обладал лучшими иммуногенными и протективными свойствами, нежели отдельно взятые антигены или их бивалентные варианты. Сконструированная трехвалентная рекомбинантная вакцина при подкожной иммунизации животных индуцировала у них образование специфических антител против каждого целевого антигена – EspA, интимина и субъединицы Stx2B – и обеспечивала защиту мышей от перорального заражения их живыми клетками *E. coli* O157:H7 и ультразвуковыми лиза-

тами этого патогена, т.е. трехвалентный химерный антиген индуцировал у животных формирование как антибактериального (антиадгезивного), так и антитоксического адаптивного иммунитета.

Amani et al. сконструировали рекомбинантную трехвалентную вакцину на основе химерного белка, содержащего в своем составе иммуногенные детерминанты EspA, Tir и интимина [7]. После подкожной аппликации этой вакцины мышам BALB/c у них детектировали высокие титры строго специфических сывороточных IgG-антител к каждому из трех антигенов. Вакцинированные мыши были защищены от перорального заражения ЕНЕС-штаммом *E. coli* O157:H7, хотя секреторные IgA-антитела не были обнаружены ни в сыворотке крови, ни в фекалиях иммунизированных животных. По результатам исследования авторы работы сделали вывод, аналогичный тому, что ранее высказывали в своей работе Babiuk et al.: специфические мукозальные sIgA-антитела не абсолютно необходимы для профилактики мышей линии BALB/c от колонизации их ЕНЕС-штаммом *E. coli* O157:H7 [4]. Авторы, как и Babiuk et al., допускают, что антиколонизационный эффект вакцины в эксперименте обеспечивался специфическими сывороточными IgG-антителами, которые трансдуцировались через барьер слизистой оболочки кишечника и секретировались в просвет кишечной трубки, где и осуществляли свой антимикробный эффект.

В работах Yazdanparast et al. и Sedighian et al. были испытаны рекомбинантные бивалентные химерные антигены: интимин + Tir и EspA + интимин соответственно [8, 9]. Оба химерных антигена после подкожной иммунизации мышей линии BALB/c индуцировали у них образование высоких титров специфических сывороточных IgG-антител и защищали мышей от перорального заражения живыми клетками *E. coli* O157:H7: у вакцинированных животных концентрация патогена в фекалиях была намного ниже и выделение его заканчивалось в более короткие сроки, чем у контрольных (невакцинированных) мышей. В работе Yazdanparast et al. отмечается, что бивалентные химерные протеины по своей иммуногенности и протективности уступают трехвалентной вакцине (EspA + интимин + Tir), описанной в работе Amani et al. [7, 8].

Lin et al. изучили иммуногенные и протективные свойства бивалентного слитного белка EspA + Tir при интраназальной и подкожной иммунизации мышей линии BALB/c [10]. В опытах на животных было показано, что интраназальная иммунизация индуцирует у мышей как системный (IgG), так и мукозальный (sIgA) иммунный ответ. Мыши, иммунизированные интраназально, были лучше защищены от перорального заражения живой культурой *E. coli* O157:H7, чем мыши, иммунизированные подкожно. Авторы сделали заключение, что слитный белок EspA + Tir может рассматриваться как перспективная субъединичная вакцина в борьбе со STEC-инфекцией.

Rahjerdi et al. сконструировали четырехвалентный рекомбинантный химерный белок, состоящий из двух антигенных детерминант энтеротоксигенных *E. coli* – (ETEC)-адгезина CfaB и В-субъединицы термолабильного энтеротоксина (LT) и двух эпитопов ЕНЕС – интимина и В-субъединицы шига-токсина Stx2 [11]. Полученный химерный антиген при под-

кожной иммунизации мышей линии BALB/c индуцировал у них образование высоких титров специфических IgG-антител. В опытах *in vitro* на CHO- и HeLa-клетках было показано, что сыворотка иммунных мышей нейтрализовала токсическое действие как LT-, так и Stx2-токсинов. Иммунизированные четырехвалентным слитным антигеном мыши, в отличие от контрольных (неиммунизированных), выжили после интраперитонеального введения им смертельных доз LT- и Stx2-токсинов. Авторы заключили, что сконструированная ими химерная иммунодоминантная структура, включающая в себя антигенные эпитопы адгезинов и В-субъединиц LT и Stx2, способна защитить животных одновременно от энтеротоксигенных и энтерогеморрагических *E. coli* и может рассматриваться в качестве кандидатной бивалентной вакцины.

Li et al. исследовали иммуногенные и протективные свойства рекомбинантного протеина Раа, адгезина, впервые обнаруженного у энтеропатогенных *E. coli* (EPEC), выделенных от свиней [12]. Этот же антиген был детектирован и у штаммов ЕНЕС. При интраперитонеальной иммунизации мышей протеином Раа у них образовывались высокие титры специфических сывороточных антител класса IgG. Иммунизация мышей антигеном Раа была эффективнее, чем иммунизация мышей интиминем *E. coli* O157:H7: они были лучше защищены от колонизации и от гибели при пероральном заражении их смертельными дозами клеток *E. coli* O157:H7.

Иммуногенные и протективные свойства адгезина интимина и ведущих протеинов системы T3SS (EspA, EspB и Tir и других антигенов), помимо лабораторных животных, были изучены и в опытах на сельскохозяйственных животных: крупном рогатом скоте, свиньях, овцах и козах – основных естественных носителях шига-токсин-продуцирующих *E. coli* [13–15].

Так, в работах Potter et al. и Peterson et al. было показано, что внутримышечная или подкожная иммунизация бычков супернатантами, содержащими два (EspA и Tir) или четыре протеина (EspA, EspB, Tir и интимин), индуцировали у них образование высоких титров специфических IgG в сыворотке крови [16, 17]. Иммунные животные были лучше защищены от естественной колонизации ЕНЕС-штаммом *E. coli* O157:H7 по сравнению с контрольными (неиммунизированными) животными: они реже инфицировались, а в случае заражения их фекалии содержали значительно меньшее количество клеток *E. coli* O157:H7 по сравнению с невакцированными животными.

McNelly et al. испытали на телятах иммуногенные и протективные свойства жгутикового антигена H7, одного из адгезинов ЕНЕС-штамма *E. coli* O157:H7 [18]. При внутримышечной аппликации препаратов флагеллина H7 у животных обнаруживали высокие титры анти-H7-специфических IgG- и sIgA-антител как в сыворотке крови, так и в назальных секретах; в незначительных количествах оба класса антител обнаруживали в ректальном содержимом. Иммунизация телят флагеллином H7 ректальным способом индуцировала у них образование sIgA-, но не IgG-антител. После перорального заражения у телят, иммунизированных внутримышечно, отмечали существенное снижение концентрации *E. coli* O157:H7 в фекалиях по сравнению с таковой у контрольных (неиммунизированных) животных. Ректальная иммунизация

телят флагеллином H7 оказалась неэффективной: она не снижала колонизационной активности патогена в кишечном тракте животных. В этом эксперименте было показано также, что добавление антигена H7 к вакцине, состоящей из комбинации рекомбинантных белков EspA, Tir и интимина, существенно увеличивало ее протективные свойства. При этом защитные свойства вакцины коррелировали с системным и мукозальным иммунным ответом на отдельные антигены, входящие в ее состав.

В аналогичных исследованиях Vilte et al. было продемонстрировано, что внутримышечная иммунизация телят двумя ключевыми колонизационными факторами ЕНЕС – интиминем-γ и EspB – индуцировала у животных образование высоких титров сывороточных IgG на оба антигена [19]. Секреторные мукозальные IgA-антитела в сыворотке крови иммунизированных телят не выявлялись, однако они в значительных количествах присутствовали в слюне этих животных. После экспериментального заражения телят культурой *E. coli* O157:H7 у иммунизированных животных отмечали значительное снижение концентрации выделяемого с фекалиями патогена по сравнению с таковой у контрольных (неиммунизированных) животных. Авторы делают заключение, что системная иммунизация крупного рогатого скота препаратами интимина и EspB может рассматриваться в качестве перспективной стратегии по снижению носительства и распространения во внешней среде основного возбудителя ГК и ГУС – ЕНЕС-серотипа O157:H7.

Хороший иммуногенный и протективный эффект был получен при внутримышечной иммунизации овец комбинированной вакциной, включавшей в свой состав рекомбинантные антигены ЕНЕС – протеины EspA, EspB и интимин: у вакцинированных животных после их перорального заражения клетками *E. coli* O157:H7 было отмечено значительное снижение количества выделяемого с фекалиями патогена по сравнению с контрольными овцами, получавшими вместо вакцины плацебо. Эта защита животных от колонизации штаммом *E. coli* O157:H7 коррелировала с антительным IgG-специфическим ответом животных на каждый антиген вакцины [20].

Zhang et al. сконструировали четырехвалентную вакцину – рекомбинантный слитный белок, состоящий из антигенных детерминант ЕНЕС – флагеллина H7, пилей геморрагических *E. coli* (HCP), протеинов Tir и интимина (H7-HCP-Tir-интимин), и испытали ее на козах [21]. При подкожной иммунизации животных вакцина индуцировала у них образование высоких титров специфических сывороточных IgG-антител; в фекалиях большинства иммунизированных коз детектировали мукозальные секреторные IgA-антитела. В эксперименте *in vitro* было показано, что сывороточные антитела против слитного белка H7HCPТirинтимин существенно снижали адгезию клеток *E. coli* O157:H7 к клеткам HEp-2. У вакцинированных животных уже на 5-й день после их перорального заражения клетками *E. coli* O157:H7 патоген в фекалиях не детектировали, в то время как у контрольных (невакцинированных) животных выделение патогена продолжалось в течение всего срока наблюдения (14 дней).

Весьма интересные результаты были получены Dean-Nystrom et al. при изучении роли пассивного специфического иммунитета в профилактике ЕНЕС-инфекции [22]. Авторы

показали, что внутримышечная двухразовая иммунизация супоросных свиноматок очищенным препаратом интимина вместе с адъювантом индуцировала у животных образование высоких титров специфических антител к интимину как в сыворотке крови (1:10 000), так и в молозиве (1:100 000). Новорожденные поросята, получавшие молозиво от вакцинированных матерей в течение 8 ч после рождения, оказались защищенными от перорального заражения их культурой ЕНЕС О157:H7; у поросят не было отмечено каких-либо патологических изменений в кишечном тракте. Поросята, родившиеся от невакцинированных свиноматок, оказались незащищенными от заражения их *E. coli* О157:H7: они заболели и погибали.

Представленные выше результаты научных исследований, полученные на лабораторных и сельскохозяйственных животных, свидетельствуют о возможности использования в качестве иммунодоминантных рекомбинантных антигенов белков III типа секреции ЕНЕС – EspA, EspB, Tir, а также интимина, флагеллина H7 и недавно идентифицированного поверхностного антигена Раа для конструирования субъединичных вакцин против ЕНЕС-инфекции. Препараты указанных антигенных детерминант или их слитные структуры (химерные белки), полученные генно-инженерными методами, будучи введенными животным парентерально (подкожно, внутримышечно, интраперитонеально) или интраназально, способны индуцировать у них системный и мукозальный иммунные ответы, обеспечивающие защиту макроорганизма от перорального заражения ЕНЕС-штаммами. Важно отметить, что даже в том случае, когда при парентеральной иммунизации у животных в содержимом кишечника не удается детектировать мукозальные секреторные антитела класса IgA, животные остаются защищенными в разной степени от перорального заражения их энтерогеморрагическими эшерихиями, возбудителями ГК и ГУС человека. Важно акцентировать внимание и на другом факте – колостральные (молозивные) антитела против интимина могут защитить новорожденных животных от перорального заражения их ЕНЕС-штаммами, т. е. пассивно приобретенный (через молозиво) иммунитет может быть таким же эффективным, как и адаптивный, индуцированный введением специфических антигенов.

Нельзя не отметить и факт возможного формирования местного интестинального мукозального иммунитета у мышей после скармливания им биомассы растительных клеток трансгенного табака, продуцирующих интимин (Int 261), или этой биомассы вместе с адъювантом [3].

Кандидатные субъединичные вакцины на основе иммуногенных детерминант шига-токсинов Stx1 и Stx2

Главным патогенетическим факторам STEC-штаммов, как это уже указывалось выше, являются продуцируемые ими шига-токсины Stx1 и Stx2, обладающие нефро-, цито-, энтеро- и нейротоксичностью. Поэтому вполне логичными являются исследования по разработке субъединичных вакцин, способных защитить человека от шига-токсинов *E. coli*. Особенно актуальны эти вакцины для защиты от STEC-штаммов, у которых отсутствуют характерные для патогруппы ЕНЕС антигены Т3SS, интимин и другие известные поверхностные антигены. К таким штаммам, например, относится высоковирулентный для человека гибридный штамм

E. coli О104:H4 [23]. Поэтому специфическая профилактика инфекции, вызываемой не-ЕНЕС-шига-токсин-продуцирующими штаммами у людей, в настоящее время возможна лишь с помощью антитоксических вакцин или лечебных моноклональных антител.

Ниже мы представляем краткий анализ исследований по разработке антитоксических субъединичных рекомбинантных вакцин на основе иммуногенных детерминант белков А- и В-субъединиц шига-токсинов Stx1 и Stx2.

В 1992 г. Gordon et al. опубликовали работу по исследованию иммуногенных свойств препарата генетически модифицированного (нетоксичного) шига-токсина Stx2e, нативный аналог которого является основным патогенетическим специфичным фактором отечной болезни свиней [24, 25]. Авторы показали, что иммунизация свиней «генетическим» токсидом Stx2e индуцировала у животных образование специфических токсиннейтрализующих антител. В 1996 г. эти же исследователи изучили протективные свойства полученного токсоида Stx2e в эксперименте на большой группе поросят [26]. Животных в возрасте 1–2 нед. вакцинировали подкожно дважды в дозе 50 мкг токсоида вместе с адъювантом оксида алюминия (Al(OH)₃). После отъема в возрасте трех месяцев вакцинированные поросята были заражены перорально штаммом *E. coli*, продуцентом шига-токсина Stx2e, в дозе 1×10^{10} КОЕ. Вакцинированные животные оказались защищенными от развития отечной болезни, в то время как контрольные (невакцинированные) поросята заболели и погибали. Таким образом, были получены доказательства возможности использования токсоида Stx2e, полученного генетическими методами, в качестве вакцинного препарата для профилактики свиней от отечной болезни, вызываемой штаммами *E. coli*, продуцирующими шига-токсин типа Stx2e.

Ishikawa et al. с помощью сайт-специфического мутагеназа гена А-субъединицы Stx1 получили нетоксичный для Vero-клеток и мышей препарат шига-токсина Stx1 [27]. Трехкратная подкожная иммунизация мышей токсидом в дозе 60 мкг вместе с полным адъювантом Фрейнда индуцировала у мышей образование антител, которые *in vitro* нейтрализовали токсическую активность нативного шига-токсина Stx1. Иммунизированные токсидом Stx1 животные оказались защищенными от 100 LD₅₀ нативного шигатоксина Stx1. Все контрольные (невакцинированные) мыши от этой дозы погибли. Авторы работы рассматривают полученный ими препарат токсоида в качестве хорошего кандидатного антигенного компонента при создании антитоксической вакцины против Stx1-продуцирующих штаммов *E. coli*.

Marcato et al. провели исследование иммуногенных и протективных свойств протеина субъединицы В шига-токсина Stx2 в опытах *in vitro* и *in vivo* [28]. Мышей иммунизировали трехкратно подкожно, используя для этого либо только рекомбинантный протеин Stx2B (в дозе 30 мкг), либо конъюгат Stx2B с белком KHL (keyhole limpet hemocyanin) вместе с пятью различными адъювантами. Было показано, что сам по себе протеин субъединицы Stx2B обладает слабой иммуногенностью, в то время как конъюгат Stx2B + KHL индуцировал у мышей образование специфических антитоксических антител и частично (в 10% случаев) защищал вакцинированных животных от летальной дозы голотоксина Stx2. В то же время добавление к конъюгату Stx2B + KHL адъювантов Ribi

(Synthetic trehalose dicorynomycolate), содержащего синтетическую трегалозу дикориномиколат, или 2%-го гидрогеля алюминия существенно повышали его протективные свойства. При использовании адъюванта Ribi вакцинированные мыши выживали в 100% случаев, а при использовании адъюванта 2%-го гидрогеля алюминия сыворотки от иммунизированных животных обладали нейтрализующей Stx2 активностью и в 80% случаев защищали Ramos Вклетки от шигатоксина. Авторы считают, что предложенный ими конъюгат субъединицы Stx2B с белком KHL может быть использован для изготовления вакцины для защиты человека от ЕНЕС-инфекции.

Wen et al., используя генетические методы, сконструировали рекомбинантные протеины субъединиц Stx1A и Stx2A, нетоксичные для Vero-клеток и для мышей линии BALB/c [29]. Полученными токсоидами дважды вакцинировали мышей внутрибрюшинно в дозе 1 мкг вместе с водно-масляным адъювантом Titr Max Gold. После иммунизации животных заражали интраперитонеально нативными шигатоксинами Stx1 и Stx2. Было показано, что образующиеся против токсидов Stx1A и Stx2A антитела не обеспечивали перекрестной нейтрализации токсинов: мыши, вакцинированные токсидом Stx1A, были защищены только от гомологичного Stx1 голотоксина, но не против шига-токсина Stx2, и наоборот, мыши, иммунизированные токсидом Stx2A, были защищены от гомологичного шига-токсина и не защищены от шига-токсина Stx1. Мыши, иммунизированные смесью токсидов Stx1A и Stx2A, были защищены от смертельных доз обоих токсинов. Полученные в работе данные весьма важны, их необходимо учитывать при разработке антитоксической субъединичной вакцины против STEC-инфекции.

С целью создания вакцины, способной нейтрализовать одновременно оба токсина – Stx1 и Stx2, Smith et al. сконструировали генетическую структуру (оперон), состоящую из мутантного гена *stx2A* и нативного гена *stx1B*, которая кодировала синтез нетоксичного для Vero-клеток и мышей BALB/c химерного слитного токсоида Stx2A/Stx1B [30]. Полученный химерный белок при внутрибрюшинной вакцинации мышей в дозе 4,3 мкг вместе с водно-масляным адъювантом Titr Max Gold индуцировал у животных образование высоких титров сывороточных IgG, способных нейтрализовать *in vitro* голотоксины Stx1 и Stx2. Иммунизированные Stx2A/Stx1B-токсидом мыши при внутрибрюшинном заражении их 10 LD₅₀ каждого в отдельности голотоксина (Stx1 или Stx2) в 100% случаев оставались живыми. При заражении вакцинированных мышей одновременно обоими токсинами в живых осталось 90% опытных животных. У погибших 10% мышей в сыворотке крови отсутствовали нейтрализующие антитела. Авторы работы полагают, что полученный ими химерный Stx2A/Stx1B-токсид является эффективной кандидатной антитоксической вакциной для защиты животных и человека от широкого спектра шигатоксинов, продуцируемых STEC-штаммами.

Для стимулирования иммуногенных свойств протеина B-субъединицы Stx2, которые, как уже отмечалось, весьма низкие, Tsuji et al. получили меченый гистидином протеин Stx2B – Stx2B-His и мутантный термолабильный энтеротоксин *E. coli* (mLT) с инактивированной субъединицей A, используя его в качестве адъюванта [31]. Авторы эксперимен-

тально показали, что у мышей, интраназально иммунизированных только препаратом Stx2B-His, специфические антитела не обнаруживаются. Однако после трехкратной интраназальной вакцинации препаратом Stx2B-His + mLT в сыворотке крови животных детектировали высокие титры специфических анти-Stx2B-IgG-антител, а в лаваже легких – присутствие специфических секреторных IgA. Сыворотки иммунных мышей нейтрализовали голотоксин Stx2 и защищали клетки HeLa от токсического действия этого токсина. Вакцинированные интраназально мыши после внутрибрюшинного заражения их смертельной дозой голотоксина Stx2 более чем в 50% случаев остались живыми. Эффективной была также и подкожная иммунизация животных препаратом Stx2B-His + mLT, однако пероральная иммунизация мышей даже высокими дозами Stx2B-His + mLT практически не индуцировала у животных иммунный ответ. Авторы заключают, что протеин Stx2B-His при интраназальной иммунизации вместе с мутантным нетоксичным LT-токсином могут быть использованы в качестве мукозальной вакцины для профилактики токсемии, вызываемой шигатоксинами *E. coli*.

Об успешном испытании иммуногенных и протективных свойств антитоксической вакцины, полученной из протеина EspA и мутантного (нетоксического) протеина Stx2A1, сообщили Cheng et al. [32]. Авторами было показано, что трехкратная подкожная вакцинация мышей BALB/c химерным белком EspA-Stx2A1 в дозе 100 мкг вместе с полным адъювантом Фрейнда индуцировала у животных образование высоких титров специфических сывороточных IgG против слитного белка EspAStx2A1. Сыворотка вакцинированных мышей в экспериментах на клетках линии HeLa проявляла нейтрализующую Stx2 активность и защищала клетки от гибели. Химерная вакцина обладала и протективными свойствами: после внутрибрюшинного заражения вакцинированных мышей смертельной дозой грубо очищенного токсина Stx2 19 из 20 опытных животных остались живыми. Авторы работы предлагают использовать полученный ими химерный белок EspAStx2A1 для конструирования антитоксической вакцины против STEC-штаммов.

Mohawk et al. методами генетической инженерии сконструировали токсид Stx2, меченый гистидином (Stx2-6H), с полностью инактивированной токсичностью [33]. После пятикратной внутрибрюшинной иммунизации мышей токсидом (суммарная доза 200 мкг) совместно с адъювантом Titr Max Gold у всех животных в сыворотке крови обнаруживали высокие титры специфических антиStx2-IgG-антител. В гомогенатах фекалий иммунизированных мышей уровень IgG и sIgA был низким, антитела обнаруживали только у отдельных животных. Интрагастральное введение токсоида мышам не увеличивало количество IgG и IgA в их фекалиях. Тем не менее гомогенаты фекалий 5- и 6-кратно вакцинированных мышей способны были инактивировать цитотоксичность Stx2 в эксперименте на Vero-клетках, что указывает на наличие в фекалиях нейтрализующих антител. При пероральном заражении клетками *E. coli* O157:H7 мышей, в фекалиях которых были обнаружены нейтрализующие Stx2 антитела, элиминация клеток патогена происходила гораздо быстрее, нежели у контрольных (неиммунизированных) мышей. По мнению авторов, полученные ими результаты свидетель-

ствуют о целесообразности разработки токсидной вакцины, поскольку такая вакцина способна защитить человека от системной интоксикации шига-токсином, от развития ГК и ГУС, а также будет способствовать уменьшению концентрации патогена в желудочно-кишечном тракте (антиколониционный эффект вакцины) заболевшего, что, в свою очередь, снизит риски распространения патогена среди людей.

Cai et al. исследовали иммуногенные и протективные свойства двух химерных слитных белков: ранее сконструированного ими белка Stx2B-Stx1B(2S) и вновь полученного белка Stx2Am-Stx1B (SAmB), в котором протеин А-субъединицы был лишен энзиматической активности [34]. Мышей BALB/c вакцинировали химерными белками внутрибрюшинно дважды вместе с адьювантом Фрейнда. Оба химерных белка, SAmB и 2S, индуцировали у мышей образование высоких титров специфических сывороточных IgG-антител против Stx1 и Stx2, однако титры антител, индуцируемые у мышей химерным антигеном SAmB, были достоверно выше, чем у мышей, вакцинированных антигеном 2S. Оба слитных протеина индуцировали также образование специфических сывороточных sIgA, однако титры их были намного ниже, чем титры IgG. Сыворотки мышей, вакцинированных SAmB и 2S, защищали Vero-клетки от токсического действия шига-токсинов. Тем не менее нейтрализующая активность сыворотки против шига-токсина Stx2 у мышей, иммунизированных белком SAmB, была существенно выше, чем у мышей, вакцинированных белком 2S. Мыши, иммунизированные антигеном SAmB, намного лучше были защищены от лизата *E. coli* O157:H7, содержащего шига-токсина Stx1 и Stx2, чем мыши, иммунизированные белком 2S. При внутрибрюшинном заражении мышей 10 LD₅₀ лизата в первом случае выжило 93,3% опытных животных, во втором – только 26,7%. Мыши, иммунизированные SAmB, были защищены в 100; 93,3 и 80% случаев при заражении их 10 LD₅₀ токсинов Stx1, Stx2 и Stx1/Stx2 соответственно. Авторы работы считают, что антигенные детерминанты двух субъединиц шига-токсинов Stx1B и Stx2A, совмещенные в одном слитном белке, способны индуцировать высокие титры нейтрализующих антител и обеспечивать эффективную защиту от токсического действия шигатоксинов *E. coli*. Авторы полагают, что сконструированный ими химерный белок Stx2Am-Stx1B является хорошей кандидатной вакциной против STEC-инфекции.

Gao et al. сконструировали и испытали на мышах BALB/c иммуногенные и протективные свойства слитного белка с эпитопами трех антигенов: Stx1B, Stx2B и интимина (SSI) [35]. Иммунизация мышей препаратом SSI внутрибрюшинно дважды или трижды в дозах 25 и 50 мкг соответственно, с полным и неполным адьювантом Фрейнда, индуцировала у животных образование специфических IgG (в основном IgG1) антител против Stx1, Stx2 и интимина. В сыворотке крови обнаруживали и повышенные количества Th2-зависимых интерлейкинов – IL4 и IL10; INF- γ у иммунизированных мышей не детектировался. Сыворотки иммунизированных химерным SSI-белком мышей нейтрализовали *in vitro* шига-токсина Stx1 и Stx2 и защищали от гибели клетки HeLa. Нейтрализующий титр анти-Stx2-антител в сыворотках крови иммунных животных был существенно выше титров анти-Stx1-антител. Иммунные сыворотки животных об-

ладали также и антиадгезивными свойствами: они на 83,3% ингибировали адгезию клеток *E. coli* O157:H7 к эпителиальным клеткам человека Hep-2. При изучении протективных свойств химерного белка было показано, что трижды иммунизированные мыши, зараженные перорально десятью летальными дозами живых клеток *E. coli* O157:H7, в 100% случаях остались живыми. Дважды вакцинированные мыши после их перорального заражения 50 и 100 летальными дозами патогена остались живыми в 70 и 20% случаев соответственно. Таким образом, химерный протеин SSI индуцировал у мышей не только антитоксический, но и антиадгезивный иммунные ответы. Авторы считают, что сконструированный ими химерный протеин SSI, содержащий эпитопы Stx1, Stx2 и интимин, может быть применен в качестве эффективной кандидатной вакцины против EHEC-инфекции.

Zhang et al. сконструировали слитный белок из четырех компонентов: трех иммунодоминантных детерминант EHEC – Stx2B, Tir и Stx1B (Stx2B-Tir-Stx1B) – и протеина Zot (zonula occludens toxin), представленного одноцепочечной полипептидной цепью, кодируемой генами филаментозного фага CTX ϕ *Vibrio cholerae* [36]. Подкожная или интраназальная вакцинация мышей линии BALB/c химерным белком Stx2B-Tir-Stx1B-Zot вызывала у животных образование высоких титров специфических сывороточных IgG-антител против Stx2, Tir и Stx1-антигенов, но сравнительно низкие титры специфических мукозальных sIgA обнаруживали в фекалиях большинства опытных мышей. Следует заметить, что у отдельных животных эти титры были высокими. После интраназальной иммунизации у животных детектировали низкие титры антител IgG к белку Zot. После перорального заражения клетками *E. coli* O157:H7 мышей, иммунизированных химерным белком Stx2B-Tir-Stx1B-Zot, у них отмечали резкое снижение количества выделяемых с фекалиями клеток патогена по сравнению с мышами, вакцинированными только протеином Stx2B-Tir-Stx1B (без Zot), что свидетельствует о высокой адьювантной, в том числе мукозальной, активности белка Zot. Таким образом, четырехкомпонентный химерный белок Stx2B-Tir-Stx1B-Zot по своим иммуногенным и протективным свойствам является хорошей кандидатной вакциной для защиты от EHEC-инфекции.

Аргентинские исследователи для получения антитоксической вакцины, способной защитить человека от шигатоксина Stx2, основного этиологического фактора ГК и ГУС, сконструировали слитный белок из протеина субъединицы Stx2B и пентамерного белка лумазил синтетазы *Brucella* spp. (BLS) [37]. Благодаря своей структуре пентамер BLS обладает высокой стабильностью и большой пластичностью при взаимодействии с чужеродными антигенами. Химерный протеин BLS-Stx2B при трехкратной внутрибрюшинной или подкожной иммунизации вместе с полным и неполным адьювантами Фрейнда или гидроксидом алюминия (Al(OH)₃) индуцировал у мышей BALB/c образование специфических IgG-антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью против Stx2 и его вариантов – Stx2c и Stx2d; иммунные сыворотки, введенные парентерально интактным мышам, защищали их от внутривенного введения смертельных доз шига-токсина Stx2. Вакцинированные химерным белком BLS-Stx2B мыши также были защищены от смертельных доз шига-токсина Stx2.

В другой работе этих же авторов была исследована возможность передачи нейтрализующих шига-токсин Stx2-антител от мышей-матерей, иммунизированных слитным белком BLS-Stx2B, новорожденным мышатам [38]. Было установлено, что у родившихся мышат, употреблявших молоко иммунных матерей, в сыворотке крови присутствовали специфические антитела против шига-токсина Stx2 в титрах, сравнимых с титрами антител в крови матерей. Иммунные мышата в 100% случаев были защищены от заражения их летальными дозами токсина Stx2 на протяжении длительного времени (2–3 мес.). Более того, иммунные мышата были резистентными и к пероральному заражению живыми клетками штамма *E. coli* O157:H7. Представленные выше результаты демонстрируют высокий протективный антитоксический потенциал слитного белка BLSStx2B. Этот иммунодоминантный слитный белок может быть использован, по мнению авторов, для создания субъединичной вакцины против ГУС, а также для получения лечебных нейтрализующих шигатоксин Stx2-антител.

Иранские исследователи для профилактики диарей, вызываемых у человека эшерихиями патотипов ETEC и EHEC, а также *Vibrio cholera*, предложили химерный трехвалентный протеин rLSC, состоящей из эпитопов протеинов В-субъединиц термолabileного энтеротоксина ETEC (LT), шига-токсина Stx2 EHEC и холерного токсина (CT) [39]. Генетическая структура, кодирующая синтез химерного белка rLSC, была получена из химически синтезированных генов *ltB*, *stx2B* и *ctxB*. Трехкратная подкожная иммунизация мышей BALB/c химерным антигеном rLSC вместе с полным и неполным адьювантом Фрейнда индуцировала у животных образование специфических антител против токсинов LT, Stx2 и CT. Сыворотки иммунных мышей в опытах на культурах клеток CHO и HeLa защищали их от токсического действия всех трех токсинов; они также блокировали связь токсинов LT и CT с рецептором энтероцитов моносиалоганглиозидом GM1. Следовательно, сконструированный химерный белок rLSC, по мнению авторов работы, может быть использован как иммуногенный компонент при разработке вакцин против диарей, вызываемых ETEC, EHEC и *V. cholerae*.

Интересные результаты были получены в 2018 г. Schmidt et al. при изучении влияния пассивно приобретенного иммунитета (через молозиво) и активно приобретенного иммунитета (при иммунизации телят рекомбинантным токсидом Stx1/Stx2) на носительство животными STEC-штаммов [40]. Авторы в экспериментах на новорожденных животных показали, что у телят, получавших молозиво от вакцинированных токсидом коров, титры специфических антител против Stx1 и Stx2 в сыворотке крови были существенно выше, чем у телят, родившихся от невакцинированных матерей. Сыворотка иммунных телят *in vitro* нейтрализовала шигатоксины Stx1 и Stx2 и защищала Vero-клетки от гибели при воздействии на них шига-токсинов. Активная иммунизация телят токсидом Stx1/Stx2 также индуцировала у животных специфический гуморальный ответ: их сыворотки нейтрализовали токсическое действие шига-токсинов.

Длительное наблюдение за вакцинированными телятами позволило установить, что гены *stx1* и *stx2* выявляются в фекалиях таких животных значительно реже, нежели у не-

вакцинированных животных. Авторы работы делают вывод, что вакцинация токсидом Stx1/Stx2 не только индуцирует у животных образование шига-токсин-нейтрализующих антител, но и снижает колонизационную активность STEC-штаммов, уменьшая тем самым риски распространения патогенов во внешней среде.

Lu et al. для профилактики STEC-инфекции предложили использовать антигенный конъюгат, состоящий из синтетического наномера поли-N-ацетилглюкозамина (PNAG, 9GlcNH₂) и В-субъединицы шига-токсина Stx1 (9GlcNH₂-Stx1B) [41]. PNAG – это поверхностный полисахарид, который встречается у широкого круга патогенных бактерий, включая клинические штаммы STEC различных серогрупп, и рассматривается в качестве протективного антигена для создания мультитиповых вакцин. В проведенных экспериментах авторы показали, что сыворотка кроликов, иммунизированных конъюгатом 9GlcNH₂-Stx1B в опытах *in vitro* обладала опсонизирующей киллинговой активностью, бактерицидным и токсиннейтрализующим действием. Она эффективно нейтрализовала шига-токсин Stx1 и умеренно – шига-токсин Stx2. Антитела против конъюгата 9GlcNH₂-Stx1B эффективно защищали новорожденных мышат от заражения их STEC-штаммами *E. coli* O157:H7. Здесь же следует отметить полученный в работе примечательный факт: сыворотка кроликов, содержащая антитела только против полисахарида 9GlcNH₂, также защищала мышей от заражения их клетками штамма *E. coli* O104:H4, не относящегося, как известно, к патогруппе EHEC. Авторы работы считают, что конъюгат 9GlcNH₂-Stx1B может использоваться для профилактики STEC-инфекции, вызванной разными серогруппами *E. coli*.

Представленный выше анализ работ по созданию антитоксических кандидатных субъединичных вакцин против шига-токсинов STEC-штаммов позволяет высказать следующие суждения:

На основании иммуногенных детерминант (эпитопов) протеинов нативных В-субъединиц и генетически модифицированных (нетоксичных) протеинов А-субъединиц шига-токсинов Stx1 и Stx2 можно конструировать кандидатные субъединичные вакцины, способные защитить макроорганизм от системной интоксикации шига-токсинами STEC-штаммов, независимо от их серогрупповой принадлежности, а также снизить колонизационную активность (адгезию и размножение) патогена в кишечном тракте лабораторных и сельскохозяйственных животных. Есть все основания полагать, что такие вакцины будут эффективны и для человека.

Положительный протективный эффект от иммуногенных детерминант протеинов А- и В-субъединиц шига-токсинов в силу их слабой иммуногенности можно достичь лишь в том случае, если указанные эпитопы представлены в вакцине либо в виде конъюгата с другим нецелевым белком, либо в составе слитного (химерного) антигена, также содержащего нецелевой белок, способный существенно усилить иммуногенные свойства А- и В-субъединиц.

Имуногенные и протективные свойства специфических эпитопов А- и В-субъединиц, находящихся в составе конъюгатов или слитных белков, существенно усиливаются под влиянием минеральных и других адьювантных субстанций: гидроокиси алюминия, водно-масляных эмульсий, адьювантов Фрейнда и др.

Эффективными способами доставки иммуногенных детерминант субъединиц А и В в составе субъединичной вакцины для лабораторных и сельскохозяйственных животных являются их подкожная, интраназальная и внутримышечная аппликация; пероральная доставка субъединичной антитоксической вакцины не защищает лабораторных животных от шига-токсинов *E. coli*.

Кандидатные субъединичные антитоксические вакцины в экспериментах на лабораторных и сельскохозяйственных животных способны были индуцировать не только активный (через вакцинацию), но и пассивный (через молозиво иммунных матерей) адаптивный иммунитет. Этот весьма важный факт следует учитывать при разработке вакцин для профилактики ГУС у детей первых лет жизни.

Иммуногенные детерминанты А- и В-субъединиц шига-токсинов, находясь в составе сложных химерных антигенов вместе с эпитопами основных факторов адгезии – интимин, протеинами EspA, EspB, и Tir, не конкурируют с ними и не теряют своих специфических иммуногенных и протективных свойств, т.е. А- и В-субъединицы могут использоваться для создания субъединичных вакцин, обеспечивающих макроорганизму одновременно антимикробную (антиколониционную) и антитоксическую защиту.

Заключение

Пищевая инфекция, вызываемая STEC-патогенами, широко распространена во многих странах мира, в некоторых регионах она приобрела эндемичный (природно-очаговый) характер [42]. В Российской Федерации болезнь также регистрируется, однако точные данные о ее распространении отсутствуют. Смертность от тяжелых форм STEC-инфекции, ГК и ГУС, может достигать 5–15 % [43]. Лечение болезни в основном симптоматическое, применение этиотропных антибактериальных средств противопоказано. Официально зарегистрированных вакцинных препаратов против STEC-инфекции человека в мировой практике нет. Актуальность разработки специфических вакцин против STEC-инфекции очевидна.

В первой и второй частях нашего обзора изложены основные методические подходы, используемые исследователями в настоящее время для получения кандидатных вакцин против STEC-инфекции, и проанализирована эффективность иммуногенных и протективных свойств разработанных в последние 20 лет различных типов вакцин, включая корпускулярные инактивированные, живые векторные, вакцины, приготовленные на основе клеточных оболочек (тений), липополисахаридов, ДНК- и нановакцины, а также субъединичные вакцины; рассмотрены работы по конструированию вакцин против STEC-патогенов с использованием методов обратной вакцинологии.

Проведенный анализ представленных в обзоре экспериментальных работ, осуществленных на животных моделях, показывает, что успешная защита лабораторных и сельскохозяйственных животных от STEC-инфекции достигается применением различных перечисленных выше типов вакцин. Тем не менее, по нашему мнению, субъединичные рекомбинантные вакцины являются наиболее перспективными по степени изученности, безопасности, эффективности, технологической доступности, возможности создания различ-

ных по составу рецептур. Состав иммуногенных детерминант таких вакцин может быть оперативно изменен в зависимости от типа и назначения разрабатываемого препарата, от эпидемической ситуации и от ожидаемого иммунного ответа на его применение: формирование антитоксического или антибактериального иммунного ответа.

В решении проблемы специфической профилактики STEC-инфекции среди населения наиболее актуальной задачей на сегодняшний день представляется разработка субъединичной вакцины, способной защитить человека от системной интоксикации, возникающей при тяжелых формах STEC-инфекции – ГК и, особенно, ГУС. Получение антитоксической вакцины обеспечит защиту человека от любого эпидемического STEC-штамма любой серологической группы. Это очень важное преимущество антитоксической вакцины, поскольку сейчас уже насчитывается свыше 100 серогрупп *E. coli*, способных продуцировать шига-токсины и вызывать спорадические случаи ГК и ГУС. Создать антибактериальную антиколониционную вакцину против такого количества STEC-серогрупп на основе известных антигенов адгезии не представляется возможным; сконструировать такие вакцины возможно только против небольшой группы эпидемически важных ЕНЕС-штаммов, у которых известны антигены.

Разработка эффективной антитоксической субъединичной вакцины, как следует из материалов обзора, вполне выполнимая задача. На основе эпитопов А- и В-субъединиц шига-токсинов могут быть созданы различные по сложности протективные антигены, способные индуцировать в макроорганизме антитоксический иммунитет. При этом очень важно при создании слитных (химерных) антигенов, содержащих А- и В-субъединицы шига-токсинов, которые, как известно, обладают слабой иммуногенностью, подобрать нецелевой белок – стимулятор специфического ответа макроорганизма. Важно также выбрать подходящий для приготовления вакцин минеральный адъювант. В случае успешного создания эффективной антитоксической вакцины иммунные к шига-токсинам пациенты смогут подвергаться лечению этиотропными препаратами с целью подавления колонизационной активности патогена и снижения рисков его распространения среди населения. Эффективность антитоксической субъединичной вакцины против STEC-инфекции может быть усилена за счет дополнительного введения в ее состав эпитопов нетоксичных липополисахаридов ведущих возбудителей ГК и ГУС – *E. coli* серогрупп O157, O26, O111, O113, O55, O145 и других, с учетом региональной эпидемиологической ситуации. Как известно, шига-токсины *E. coli* только вместе с липополисахаридами патогенов способны воспроизвести у лабораторных животных симптомы ГУС, сходные с таковыми у человека. Антитела против липополисахаридов играют важную роль в защите макроорганизма от интоксикации эндотоксинами патогена и от бактериемии и септицемии.

Заслуживают внимания, на наш взгляд, и исследования по разработке пероральных вакцин против STEC-инфекции. Такие вакцины, по всей вероятности, могут быть созданы на основе технологий нановакцин и живых векторных вакцин. Перспективными могут быть и исследования по конструированию методами геной инженерии и генетического редак-

тирования геномов штаммов STEC (EHEC), безопасных для человека. Они могут быть получены за счет инактивации у возбудителей ГК и ГУС функциональной активности А-субъединиц шига-токсинов Stx1 и Stx2 и факторов, обуславливающих А/Е-эффект ЕНЕС-штаммов, но сохранивших (или увеличивших) свои адгезивные свойства. Такие аттенуированные штаммы можно будет применять как специфические пробиотики, способные защитить человека от STEC(EHEC)-инфекции.

Все изложенные выше материалы дают основание надеяться на создание в ближайшие годы специфических вакцинных препаратов для борьбы со STEC-инфекцией человека.

Информация о финансировании

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

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

- Светоч ЭА, Дятлов ИА, Карцев НН, Ерусланов БВ, Канашенко МЕ, Фурсова НК. Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсино продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 1. Бактериология. 2020;5(2):56-70. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-56-70
- Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD. Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of intimin. *Infect Immun*. 1999;67(12):6409-6417.
- Judge NA, Mason HS, O'Brien AD. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun*. 2004;72(1):168-175. DOI: 10.1128/iai.72.1.168-175.2004
- Babiuk S, Asper DJ, Rogan D, Mutwiri GK, Potter AA. Subcutaneous and intranasal immunization with type III secreted proteins can prevent colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Microb Pathog*. 2008;45(1):7-11. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.01.005
- Cataldi A, Yevsa T, Vilte DA, Schulze K, Castro-Parodi M, Larzábal M, et al. Efficient immune responses against Intimin and EspB of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* after intranasal vaccination using the TLR2/6 agonist MALP-2 as adjuvant. *Vaccine*. 2008;26(44):5662-5667. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.027
- Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. *Microbes Infect*. 2009;11(10-11):835-841. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.024
- 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
- Yazdanparast A, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Jalalinadoushan M. Immunogenical study of chimeric recombinant intimin-Tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2012;7(2):45-51.
- Rad HS, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Nadooshan MR. EspA-Intimin chimeric protein, a candidate vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. *Iran J Microbiol*. 2013;5(3):244-51.
- Lin R, Zhu B, Zhang Y, Bai Y, Zhi F, Long B, et al. Intranasal immunization with novel EspA-Tir-M fusion protein induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 challenge in mice. *Microb Pathog*. 2017;105:19-24. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.01.062
- Karimi Rahjerdi A, Jafari M, Motamedi MJ, Amani J, Salmanian AH. Immunogenic Evaluation of Bivalent Vaccine Candidate against Enterohemorrhagic and Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iran J Immunol*. 2019;16(3):200-211.
- Li T, Han R, Wang Q, Wang S, Fang H, Li Z, et al. Immunogenicity of recombinant porcine attaching and effacing-associated protein compared with intimin fragment in *Escherichia coli* O157:H7-infected mice. *Foodborne Pathog Dis*. 2013;10(12):1016-1022. DOI: 10.1089/fpd.2013.1496
- 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.
- 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
- 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
- Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D, et al. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine*. 2004;22(3-4):362-369. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.08.007
- Peterson RE, Klopfenstein TJ, Moxley RA, Erickson GE, Hinkley S, Rogan D, Smith DR. Efficacy of dose regimen and observation of herd immunity from a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for feedlot cattle. *J Food Prot*. 2007;70(11):2561-2567. DOI: 10.4315/0362-028x-70.11.2561
- McNeilly TN, Naylor SW, Mahajan A, Mitchell MC, McAteer S, Deane D, et al. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infect Immun*. 2008;76(6):2594-2602. DOI: 10.1128/IAI.01452-07
- Vilte DA, Larzábal M, Garbaccio S, Gammella M, Rabinovitz BC, Elizondo AM, et al. Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with γ -intimin C₂₈₀ and EspB proteins. *Vaccine*. 2011;29(23):3962-3968. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.079
- Yekta MA, Goddeeris BM, Vanrompuy D, Cox E. Immunization of sheep with a combination of intimin, EspA and EspB decreases *Escherichia coli* O157:H7 shedding. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;140(1-2):42-46. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.11.010
- Zhang X, Yu Z, Zhang S, He K. Immunization with H7-HCP-tir-intimin significantly reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in goats. *PLoS One*. 2014;9(3):e91632. DOI: 10.1371/journal.pone.0091632
- Dean-Nystrom EA, Gansheroff LJ, Mills M, Moon HW, O'Brien AD. Vaccination of pregnant dams with intimin(O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun*. 2002;70(5):2414-2418. DOI: 10.1128/iai.70.5.2414-2418.2002
- 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
- Gordon VM, Whipp SC, Moon HW, O'Brien AD, Samuel JE. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect Immun*. 1992;60(2):485-490.
- Dobrescu L. New biological effect of edema disease principle (*Escherichia coli*-neurotoxin) and its use as an *in vitro* for this toxin. *Am J Vet Res*. 1983;44(1):31-34.
- Bosworth BT, Samuel JE, Moon HW, O'Brien AD, Gordon VM, Whipp SC. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect Immun*. 1996;64(1):55-60.

27. Ishikawa S, Kawahara K, Kagami Y, Isshiki Y, Kaneko A, Matsui H, et al. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. *Infect Immun*. 2003;71(6):3235-3239. DOI: 10.1128/iai.71.6.3235-3239.2003
28. Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. *Infect Immun*. 2005;73(10):6523-6529. DOI: 10.1128/IAI.73.10.6523-6529.2005
29. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. *Vaccine*. 2006;24(8):1142-1148. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.094
30. Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine*. 2006;24(19):4122-4129. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.035
31. Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, et al. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine*. 2008;26(4):469-476. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.11.038
32. Cheng Y, Feng Y, Luo P, Gu J, Yu S, Zhang WJ, et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2AI protein: implications for the vaccine development. *J Microbiol*. 2009;47(4):498-505. DOI: 10.1007/s12275-009-0116-8
33. Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Robinson CM, O'Brien AD. Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine*. 2010;28(30):4777-4785. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.099
34. Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, et al. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine*. 2011;29(5):946-952. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.035
35. Gao X, Cai K, Li T, Wang Q, Hou X, Tian R, et al. Novel fusion protein protects against adherence and toxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine*. 2011;29(38):6656-6663. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.106
36. Zhang XH, He KW, Zhang SX, Lu WC, Zhao PD, Luan XT, et al. Subcutaneous and intranasal immunization with Stx2B-Tir-Stx1B-Zot reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine*. 2011;29(22):3923-3929. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.02.007
37. Mejias MP, Ghersi G, Craig PO, Panek CA, Bentancor LV, Baschkier A, et al. Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and *Brucella* lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *J Immunol*. 2013;191(5):2403-2411. DOI: 10.4049/jimmunol.1300999
38. Mejias MP, Cabrera G, Fernández-Brando RJ, Baschkier A, Ghersi G, Abrey-Recalde MJ, et al. Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a *Brucella* lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera. *Infect Immun*. 2014;82(4):1491-1499. DOI: 10.1128/IAI.00027-14
39. Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi MJ, Mousavi A, et al. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. *Microbes Infect*. 2016;18(6):421-429. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.001
40. Schmidt N, Barth SA, Frahm J, Meyer U, Dänicke S, Geue L, Menge C. Decreased STEC shedding by cattle following passive and active vaccination based on recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids. *Vet Res*. 2018;49(1):28. DOI: 10.1186/s13567-018-0523-0
41. Lu X, Skurnik D, Pozzi C, Roux D, Cywes-Bentley C, Ritchie JM, et al. A Poly-N-acetylglucosamine-Shiga toxin broad-spectrum conjugate vaccine for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *mBio*. 2014;5(2):e00974-14. DOI: 10.1128/mBio.00974-14.
42. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión [The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission]. *Medicina (B Aires)*. 2006;66 Suppl 3:27-32. Spanish.
43. 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

References

- Svetoch EA, Dyatlov IA, Kartsev NN, Eruslanov BV, Kanashenko ME, Fursova NK. Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 1. *Bacteriology*. 2020; 5(2): 56–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-56-70 (In Russian).
- Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD. Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of intimin. *Infect Immun*. 1999;67(12):6409-6417.
- Judge NA, Mason HS, O'Brien AD. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun*. 2004;72(1):168-175. DOI: 10.1128/iai.72.1.168-175.2004
- Babiuk S, Asper DJ, Rogan D, Mutwiri GK, Potter AA. Subcutaneous and intranasal immunization with type III secreted proteins can prevent colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Microb Pathog*. 2008;45(1):7-11. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.01.005
- Cataldi A, Yevsa T, Vilte DA, Schulze K, Castro-Parodi M, Larzábal M, et al. Efficient immune responses against Intimin and EspB of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* after intranasal vaccination using the TLR2/6 agonist MALP-2 as adjuvant. *Vaccine*. 2008;26(44):5662-5667. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.027
- Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. *Microbes Infect*. 2009;11(10-11):835-841. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.024
- 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
- Yazdanparast A, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Jalalinadoushan M. Immunogenical study of chimeric recombinant intimin-Tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2012;7(2):45-51.
- Rad HS, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Nadooshan MR. EspA-Intimin chimeric protein, a candidate vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. *Iran J Microbiol*. 2013;5(3):244-51.
- Lin R, Zhu B, Zhang Y, Bai Y, Zhi F, Long B, et al. Intranasal immunization with novel EspA-Tir-M fusion protein induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 challenge in mice. *Microb Pathog*. 2017;105:19-24. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.01.062
- Karimi Rahjerdi A, Jafari M, Motamedi MJ, Amani J, Salmanian AH. Immunogenic Evaluation of Bivalent Vaccine Candidate against Enterohemorrhagic and Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iran J Immunol*. 2019;16(3):200-211.
- Li T, Han R, Wang Q, Wang S, Fang H, Li Z, et al. Immunogenicity of recombinant porcine attaching and effacing-associated protein compared with intimin fragment in *Escherichia coli* O157:H7-infected mice. *Foodborne Pathog Dis*. 2013;10(12):1016-1022. DOI: 10.1089/fpd.2013.1496
- 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.
- 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
- 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

16. Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D, et al. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine*. 2004;22(3-4):362-369. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.08.007
17. Peterson RE, Klopfenstein TJ, Moxley RA, Erickson GE, Hinkley S, Rogan D, Smith DR. Efficacy of dose regimen and observation of herd immunity from a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for feedlot cattle. *J Food Prot*. 2007;70(11):2561-2567. DOI: 10.4315/0362-028x-70.11.2561
18. McNeilly TN, Naylor SW, Mahajan A, Mitchell MC, McAteer S, Deane D, et al. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infect Immun*. 2008;76(6):2594-2602. DOI: 10.1128/IAI.01452-07
19. Vilte DA, Larzábal M, Garbaccio S, Gammella M, Rabinovitz BC, Elizondo AM, et al. Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with γ -intimin C₂₈₀ and EspB proteins. *Vaccine*. 2011;29(23):3962-3968. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.079
20. Yekta MA, Goddeeris BM, Vanrompay D, Cox E. Immunization of sheep with a combination of intimin, EspA and EspB decreases *Escherichia coli* O157:H7 shedding. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;140(1-2):42-46. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.11.010
21. Zhang X, Yu Z, Zhang S, He K. Immunization with H7-HCP-tir-intimin significantly reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in goats. *PLoS One*. 2014;9(3):e91632. DOI: 10.1371/journal.pone.0091632
22. Dean-Nystrom EA, Gansheroff LJ, Mills M, Moon HW, O'Brien AD. Vaccination of pregnant dams with intimin(O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun*. 2002;70(5):2414-2418. DOI: 10.1128/iai.70.5.2414-2418.2002
23. 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
24. Gordon VM, Whipp SC, Moon HW, O'Brien AD, Samuel JE. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect Immun*. 1992;60(2):485-490.
25. Dobrescu L. New biological effect of edema disease principle (*Escherichia coli*-neurotoxin) and its use as an *in vitro* for this toxin. *Am J Vet Res*. 1983;44(1):31-34.
26. Bosworth BT, Samuel JE, Moon HW, O'Brien AD, Gordon VM, Whipp SC. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect Immun*. 1996;64(1):55-60.
27. Ishikawa S, Kawahara K, Kagami Y, Isshiki Y, Kaneko A, Matsui H, et al. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. *Infect Immun*. 2003;71(6):3235-3239. DOI: 10.1128/iai.71.6.3235-3239.2003
28. Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. *Infect Immun*. 2005;73(10):6523-6529. DOI: 10.1128/IAI.73.10.6523-6529.2005
29. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. *Vaccine*. 2006;24(8):1142-1148. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.094
30. Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine*. 2006;24(19):4122-4129. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.035
31. Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, et al. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine*. 2008;26(4):469-476. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.11.038
32. Cheng Y, Feng Y, Luo P, Gu J, Yu S, Zhang WJ, et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2AI protein: implications for the vaccine development. *J Microbiol*. 2009;47(4):498-505. DOI: 10.1007/s12275-009-0116-8
33. Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Robinson CM, O'Brien AD. Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine*. 2010;28(30):4777-4785. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.099
34. Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, et al. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine*. 2011;29(5):946-952. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.035
35. Gao X, Cai K, Li T, Wang Q, Hou X, Tian R, et al. Novel fusion protein protects against adherence and toxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine*. 2011;29(38):6656-6663. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.106
36. Zhang XH, He KW, Zhang SX, Lu WC, Zhao PD, Luan XT, et al. Subcutaneous and intranasal immunization with Stx2B-Tir-Stx1B-Zot reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine*. 2011;29(22):3923-3929. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.02.007
37. Mejias MP, Ghersi G, Craig PO, Panek CA, Bentancor LV, Baschkier A, et al. Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and *Brucella* lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *J Immunol*. 2013;191(5):2403-2411. DOI: 10.4049/jimmunol.1300999
38. Mejias MP, Cabrera G, Fernández-Brando RJ, Baschkier A, Ghersi G, Abrey-Recalde MJ, et al. Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a *Brucella* lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera. *Infect Immun*. 2014;82(4):1491-1499. DOI: 10.1128/IAI.00027-14
39. Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi MJ, Mousavi A, et al. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. *Microbes Infect*. 2016;18(6):421-429. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.001
40. Schmidt N, Barth SA, Frahm J, Meyer U, Dänicke S, Geue L, Menge C. Decreased STEC shedding by cattle following passive and active vaccination based on recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids. *Vet Res*. 2018;49(1):28. DOI: 10.1186/s13567-018-0523-0
41. Lu X, Skurnik D, Pozzi C, Roux D, Cywes-Bentley C, Ritchie JM, et al. A Poly-N-acetylglucosamine-Shiga toxin broad-spectrum conjugate vaccine for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *mBio*. 2014;5(2):e00974-14. DOI: 10.1128/mBio.00974-14.
42. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión [The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission]. *Medicina (B Aires)*. 2006;66 Suppl 3:27-32. Spanish.
43. 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

Информация об авторах:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и 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

NDR при заболеваниях

Показано, что NDR1 и 2 участвуют в противовирусном ответе организма, положительно регулируя противовирусный иммунный ответ, индуцированный геном I, индуцируемым ретиноевой кислотой. Имеются некоторые свидетельства того, что киназы NDR1 и 2 были включены в частицы ВИЧ-1. Они также участвуют в патогенности ВИЧ-1, поскольку NDR1 и 2 могут расщепляться протеазой ВИЧ и, следовательно, ингибировать их активность.

Также было показано, что NDR1 и 2 действуют как защитные свойства от других заболеваний. NDR1 может фосфорилировать Yes-ассоциированные белки и, следовательно, действовать как опухолевый супрессор при колоректальном раке. Более того, NDR1 участвует в репликации, положительно регулируя дупликацию центросом. Следовательно, NDR1 и 2 играют разные роли в иммунной системе животных, начиная от нормальной клеточной функции и заканчивая защитой хозяина от патогенных инфекций и воспаления.

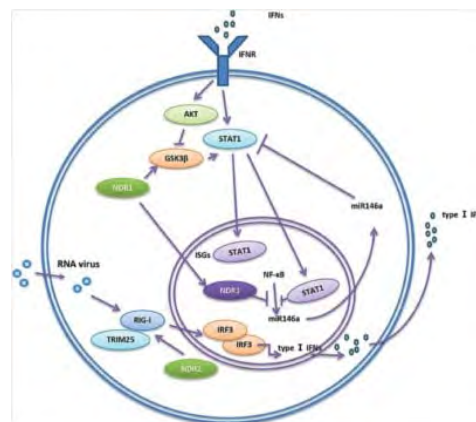


Рисунок скопирован с сайта <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00534/full>

NDR1 и 2 могут быть задействованы как в заболеваниях растений, так и в заболеваниях животных, в дополнение к их роли в общем иммунитете и воспалении. У растений устойчивость к бактериальным и грибковым патогенам опосредуется генами устойчивости растений к болезням (R). Однако для этого также требуется ген NDR1. Следовательно, гены NDR неразрывно связаны с иммунным ответом против болезней как у растений, так и у животных.

Растения с дефицитом NDR1 демонстрируют повышенный рост популяций патогенов. В частности, NDR1 необходим для устойчивости к бактериальным и грибковым патогенам. Мутации NDR1 увеличивают восприимчивость растений к штаммам бактерий *Pseudomonas syringae* и грибов *Peronospora parasitica*.

NDR1/2's Role in Infection [Electronic resource].

News-Medical.net. 2020. URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/NDR12e28099s-Role-in-Infection.aspx>

Фитонциды: история и перспективы применения

С.А.Чубатова

Международный фонд научно-образовательных программ биотехнологий им. академика И.Н.Блохиной,
Москва, Российская Федерация;
ООО «ЭРБИ», Москва, Российская Федерация

Предложен краткий информационный материал по истории применения фитонцидов в медицинской практике за последние несколько столетий и результаты собственных исследований изучения свойств новых средств на основе фитонцидов в липосомах. Эффективность их использования на протяжении 20 лет в рамках программы «Экология воздушного пространства помещений» указывает на перспективность этого направления.
Ключевые слова: фитонциды, липосомы, антибактериальные средства

Для цитирования: Чубатова С.А. Фитонциды: история и перспективы применения. Бактериология. 2020; 5(3): 60–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-60-67

Phytoncides: history and application prospects

S.A.Chubatova

Academician I.N.Blokhina International Fund for Biotechnology, Moscow, Russian Federation;
LLC «ERBI», Moscow, Russian Federation

A brief informational material on the history of the use of phytoncides in medical practice over the past few centuries and the results of our own research on the study of the properties of new drugs based on phytoncides in liposomes is proposed. The effectiveness of phytoncides use for 20 years within the framework of the «Indoor Airspace Ecology» program indicates that this direction is promising.
Key words: phytoncides, liposomes, antibacterial agents

For citation: Chubatova S.A. Phytoncides: history and application prospects. Bacteriology. 2020; 5(3): 60–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-60-67



Чубатова Светлана Александровна, доктор биологических наук, главный технолог научно-производственной компании «ЭРБИ». Работала во ВНИИ ПМ с 1977 по 1998 г. Автор ряда патентов РФ и двух международных в области биотехнологии, медицины и сельского хозяйства. Ряд научных публикаций посвящен практическому применению препаратов на основе липосом, бактериофагов и фитонцидов в соавторстве. Научные разработки, в том числе нормативная документация по технологии производства, используются при промышленном выпуске ряда препаратов профилактического и гигиенического профиля.

«Нужное для неучей» – это название книги армянского врачевателя XV века Амасиаци, собрание накопленных знаний целителей Древнего Востока и Запада, которая переведена на русский язык в XX веке. Она сохранена для врачей XXI века не случайно. В условиях современного кризиса в области фармакологии следует обратить внимание на опыт лечения заболеваний микробной этиологии в прошлые века. Знания врачей XIV–XV веков в области применения фитонцидов коррелируют с опытом современ-

ной доказательной медицины по применению многих описанных лекарственных растений [1].

Фитонциды – это образуемые растениями летучие биологически активные вещества, убивающие или подавляющие рост и развитие бактерий, вирусов, микроскопических грибов и простейших.

Термин был предложен Б.П.Токиным (рис. 1) в 1928 г. и, несмотря на прения в научных кругах, утвердился именно он. Токин Борис Петрович (1900–1984), лауреат Сталинской

Для корреспонденции:

Чубатова Светлана Александровна, доктор биологических наук, заместитель генерального директора по науке Международного фонда научно-образовательных программ биотехнологий им. академика И.Н.Блохиной, главный технолог ООО «ЭРБИ»

Адрес: 117638, Москва, ул. Азовская, 6, корп. 3, блок 9-2
E-mail: cler719@mail.ru

For correspondence:

Svetlana A. Chubatova, PhD, DSc (Biological Sciences), deputy general director for science of the Academician I.N.Blokhina International Fund for Biotechnology, chief technologist of LLC «ERBI»

Address: 6, bldg. 3, block 9-2 Azovskaya str., Moscow, 117638, Russian Federation
E-mail: cler719@mail.ru

The article was received 25.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

Статья поступила 25.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

премии (1950 г.), Государственной премии СССР (1984 г.), много лет посвятил изучению свойств «целебных ядов растений», охарактеризовал их, выделил отдельные компоненты, научно доказал способность фитонцидов подавлять рост и развитие микроорганизмов, особенно патогенных для человека. В 1941 г. Токин Б.П. возглавил комитет ученых по содействию промышленности и сельскому хозяйству в военное время, который помогал врачам госпиталей в использовании фитонцидов в качестве антисептиков при лечении раненых.

XX век был веком открытий в области медицины. Для эпидемиологии же важным стал XVIII век, когда были разработаны и введены первые карантинные меры, что помогло человечеству справиться с пандемиями, в том числе чумы. Особую роль в этом сыграл Даниил Самойлович Самойлович (настоящая фамилия Сушковский, 1744–1805), выдающийся российский медик, основатель эпидемиологии в Российской империи (рис. 2). В 1767 г. он получил звание врача, а в 1768–1770 гг. уже находился на театре боевых действий русско-турецкой войны и, как полковой врач, достиг значительного снижения заболеваемости и смертности личного состава. Много внимания он уделял чуме, которая была причиной смерти солдат и мирного населения. Доктор изучал методы лечения и меры профилактики, но особенно следил за людьми, успешно излечившимися от чумы. В 1770 г. Самойлович был направлен из Бухареста в Оренбург. Путь проходил через карантинные заставы, что давало возможность общения со многими врачебными сообществами, методами исследования и средствами лечения, в том числе на основе растений. Лечение травами тогда было очень популярно: часто использовали настои, бальзамы, окуривание травами, применяли специи. Одним из примеров использования фитонцидов для защиты медперсонала было прослу-



Рис. 2. Д.С.Самойлович.

шивание пульса через табачный лист. По пути Самойлович добровольно остался в Москве, стал членом комитета борьбы с чумой и заведующим чумными госпиталями. Он начал широко применять фитонциды березы и сосны для обработки одежды, опираясь на опыт лекарей Италии и других стран, где использовали розмарин и шалфей, которых в Москве не было. По распоряжению Самойловича медперсонал работал только в халатах и обуви, пропитанных уксусом или смазанных березовым дегтем или смолой сосны.

Самойлович первый предположил микробное происхождение чумы, первым доказал возможность противочумной прививки, используя для этого содержимое из чумных бубонов больных. Он первым применил методику сортировки больных и много других мер, благодаря которым, при содействии графа Орлова, страшная эпидемия была остановлена и ликвидирована. Свой опыт Самойлович изложил в научных трудах, которые высоко оценило мировое сообщество. Самойлович стал членом 9 зарубежных академий. За свою жизнь карантинный доктор шесть раз встречался с чумой и успешно ликвидировал эпидемии. К сожалению, несовершенство микроскопов не позволило Самойловичу увидеть чумную палочку, которая была открыта лишь 110 лет спустя. Мероприятия же, им разработанные, спасли жизни тысячам и тысячам людей.

«Если память мужей отличных, споспешествовавших благу Отчизны, имеет право на благодарность потомков, то Самойлович оную заслуживает по всей справедливости». Всеобщий журнал врачебной науки (1813 г.). В городах Николаев и Синельниково Даниилу Самойловичу нашими современниками установлены памятники.

Еще одна выдающаяся личность в эпидемиологии – это Ермольева Зинаида Виссарионовна (1898–1974 гг.), совет-



Рис. 1. Б.П.Токин.



Рис. 3. З.В.Ермольева.

ский микробиолог и эпидемиолог, создательница антибиотиков СССР, лауреат Сталинской премии I степени, прототип главной героини известной книги Аверина о российских микробиологах, о борьбе с чумой, об открытии пенициллина. Эта книга существенно повлияла на выбор моей профессии (рис. 3). Жизнь Ермольевой З.В. – это постоянные наблюдения, анализ и открытия. Открытие антибиотиков было не случайным, а связанным с ее постоянным интересом к самым разным способам лечения инфекционных болезней, изучению антагонистических взаимоотношений внутри популяции микроорганизмов, поиском чувствительности возбудителей к разным агентам, в том числе к применению фитонцидов. Менее известным подвигом Ермольевой и ее сподвижников была ликвидация эпидемии холеры под Сталинградом с помощью фаготерапии. Бактериофаги выделяли в условиях полевых госпиталей, часто под обстрелом, используя биоматериал больных. Успешное лечение защитников Сталинграда стало существенным вкладом в победу над фашистами на Волге.

Исторические эпизоды из жизни Самойловича и Ермольевой были использованы в фильме «Плесень» (2008 г.).

Мое увлечение фитонцидами началось только в 1998 г. На тот момент уже был накоплен опыт работы с соединениями природного происхождения, основанный на исследованиях в лаборатории мембранологии ВНИИ ПМ с 1977 г. Опыт показывал некоторое преимущество природных активных веществ по сравнению с синтетическими аналогами. Под руководством Перелыгина В.В. и Капрельянца А.С. нашей группе удалось разработать ряд методик по включению в липосомы антиоксидантов, иммуномодуляторов и пластификаторов, выделенных из природного сырья, для модификации мембран живых клеток. Совместно с Потаповым В.Д. мы установили, что модификация мембран бактерий фосфолипидами и гликозидами позволяла повысить их выживаемость при высушивании и повлиять на уровень взаимодействия с макрофагами.

Огромное влияние на формирование моих научных интересов оказало участие в Международном конгрессе иммунологов-аллергологов в 1998 г. в Сочи, где в рамках сателлитного симпозиума обсуждались результаты по использованию природных соединений, в частности фитонцидов и иммуномодуляторов, для создания препаратов, эф-

фективных при лечении заболеваний микробной этиологии, особенно у детей, страдающих аллергодерматозами.

Доклад профессора Николаевского В.В., директора Всесоюзного НИИ курортологии (г. Ялта), буквально перевернул мое представление об ароматерапии. Как врач иммунолог-аллерголог, он рассматривал эфирные масла не только как ароматы, а как сложнейшие комплексы, разносторонне воздействующие на организм человека. Сочетанное выраженное бактерицидное действие с иммунотропным, адаптогенным и спазмолитическим, а особенно с потенцирующим действием при антибиотикотерапии обеспечивается очень сложным составом эфирных масел. В многочисленных исследованиях Николаевского было доказано, что подавление роста патогенных микроорганизмов сочетается с сохранением микробиома человека. На тот момент уже были хорошо изучены свойства основных активных соединений – эвгенола, ментола, пинена, тимола, оцимена, камфена, гераниола, борнеола, карвакрола, цитраля, мерцена. Николаевский подчеркивал важность присутствия и других активных соединений, которые обязательно присутствуют, пусть даже в минорных количествах, в эфирном масле. Успехи, достигнутые в применении эфирных масел при лечении и для профилактики многих заболеваний в условиях курорта, а также в условиях работы промышленных предприятий, в космосе, в школах и дошкольных учреждениях, требовали более широкого применения [2]. Николаевский отстаивал необходимость обязательного присутствия фитонцидов и адаптогенов – он их называл растительными биорегуляторами – в составе воздушной среды помещений для сохранения здоровья современного человека. Это, в свою очередь, требовало создания оптимальной готовой формы препаратов.

Профессор Тарумов В.С. (ГНЦ ПМ, Оболенск), как специалист по изготовлению готовых препаратов, предложил разработку средств с фитонцидами в липосомах. Липосомы обеспечивают активный транспорт и пролонгированное воздействие на иммунокомпетентные клетки, стабилизируют легколетучие молекулы, предохраняют фитонциды от окисления. Участники симпозиума поддержали это направление. И в том же году на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии Нижнего Новгорода под руководством академика Блохиной И.Н. были проведены первые опыты на клинических штаммах микроорганизмов. Штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* оказались чувствительными к воздействию эфиров монарды, чайного дерева, шалфея, лаванды при насыщении ими воздушного пространства.

Блохина Ирина Николаевна (рис. 4), как ученица Ермольевой, обладала широким кругозором и, несмотря на приоритетное направление в исследованиях бактерий кишечной группы (холеры, брюшного тифа, дизентерии Флекснера, кишечной палочки), считала необходимым учитывать возможность ассоциативных инфекций и быструю смену возбудителей при воспалительных заболеваниях. Для нее было очевидным, что успех борьбы с любой инфекционной болезнью зависит не только от всесторонней характеристики ее возбудителя и отличий от других представителей микробов, но и от состояния иммунной системы

человека. В этой связи хочется сказать, что итоги труда академика Блохиной – это не только создание детского внутривенного иммуноглобулина и содействие в организации мощного модернизированного производства бактериофагов в стране. С такой же требовательностью она относилась к выпуску добавок к пище, в частности знаменитого «Эликсира Блохиной» на основе шалфея и сбора других лекарственных трав для профилактики бронхолегочных заболеваний. В эффективности этого средства я многократно убедилась на практике. Ирина Николаевна всегда интересовалась новыми направлениями, инициировала любой росток развития отечественной науки. Поэтому она была активным сторонником продолжения исследований Николаевского по фитонцидам, которые одновременно угнетают рост микроорганизмов и благотворно влияют на организм человека, особенно через воздушную среду, и многому нас научила. Она оставила нам эти строки, как заветное:

*«...и продолжая жизнь мою,
продолжите мой путь,
как будто я еще в строю
и дни мои идут».*

Круг моих учителей расширился, а новые условия в стране с 1990–2000-х гг. позволили создать ряд новых средств на основе фитонцидов в липосомах и внедрить их в практику в качестве профилактико-гигиенических средств. Таким образом, результаты научных исследований Блохиной и Николаевского легли в основу прикладных исследований в области дерматологии, косметологии и стоматологии, а первые средства были выпущены на производстве ЗАО «МИРРА» в Оболенске. Препараты этого ряда с 1999 г. успешно применяются в комплексном лечении заболеваний полости рта, в дерматологии, ветеринарии, косметологии [3].



Рис. 4. И.Н.Блохина.

Одним из продолжателей нового направления стала внучка Блохиной И.Н., стоматолог, к.м.н., доцент кафедры практической стоматологии Российского национального исследовательского медицинского института им. Н.И.Пирогова Е.Г.Михайлова.

Интересны переплетения судеб людей. Те, кто пришел в 1970-х гг. в ГНЦПМ и работал в лаборатории мембранологии, опять встретились в новом проекте: А.С.Капсельянц, В.Д.Потапов, Т.Х.Борзенкова. Каждый прошел свой отдельный путь, став ведущим специалистом в других подразделениях. А в 2008 г. мы снова встретились в проекте по изучению свойств инновационных средств на основе фитонцидов для профилактики воздушно-капельных инфекций. В.Д.Потапов стал научным руководителем диссертации у одного из представителей младшего поколения – Чубатовой О.И.

В 2008 г. в рамках программы по разработке безотходного производства биотоплива (этанол) в «Госниисинтез-белок» были выделены фитонциды из древесины сосны и осины и изучены их бактерицидные свойства [4]. Масштабность производства биотоплива и результаты исследований позволили рекомендовать фитонциды для обработки воздушной среды помещений: медицинских кабинетов, палат стационаров, аудиторий образовательных учреждений и прочих помещений, где количество микроорганизмов в воздухе имеет значение. Длительное изучение эффективности технологии обработки воздушного пространства средствами с фитонцидами позволило разработать разные схемы применения. Было показано, что на фоне использования новой технологии применения фитонцидов в присутствии человека достигается сохранение уровня контаминации воздушного пространства в пределах 50–150 КОЕ в 1 м³ в течение всей рабочей смены [5, 6].

В 2009 г. в Институте биохимии им. А.Н.Баха РАН (Москва) под руководством Капсельянца А.С. были проведены первые исследования по воздействию фитонцидов на авирулентные штаммы микобактерий туберкулеза [5]. Полученные результаты позволили провести расширенные испытания на базе ГНЦ ПМБ с Потаповым В.Д., Фурсовой Н.К., Домотенко Л.В., Акимовой Н.Н. и другими сотрудниками уже на вирулентных штаммах микобактерий. Была установлена активность средств на основе фитонцидов в липосомах в отношении чувствительных и резистентных штаммов [7]. Далее было оценено противотуберкулезное действие на лабораторных животных при разных способах заражения, в том числе и аэрогенным путем [8, 9]. Результаты указывали на выраженное противомикробное и иммуностимулирующее действие и были доложены на 51-й Междисциплинарной конференции по антимикробным препаратам и химиотерапии (Чикаго, 17–20 сентября 2011 г.) [10].

Одновременно изучали действие средств с фитонцидами на штаммы других микроорганизмов. Результаты одного из исследований представлены в табл. 1. Из данных, полученных Фурсовой Н.К. на клинических штаммах, следует, что фитонциды проявляют активность в отношении резистентных штаммов.

В 2012–2014 гг. под руководством профессора Корниловой З.Х. проведены исследования в ряде лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) Москвы и Московской области с группами больных туберкулезом с множественной

Таблица 1. Определение активности средства с фитонцидами сосны, бархатцев и монарды в отношении резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Штамм	Город	Дата выделения	Источник выделения штамма	Резистентность к антимикробным препаратам	Разведение препарата «ТАГЕТОН»				
					Цельное	1:2	1:4	1:8	1:16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-9	Краснодар	10.09.2012	Окружающая среда (вода)	AMP	+++	++	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-9	Москва	24.04.2013	Человек (эндотрахеальный аспират)	AMC, AMS, CEF, CTX, CAZ, CPS, FEP, AZR, THR, PHO, NIT	++	+	+	+/-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-9	Москва	13.05.2013	Человек (моча)	AMC, AMS, AZR, CEF, CTX, CTA, CAZ, CPS, FEP, IMI, MER, TET, CIP, CM, TOB, THR, PHO, NIT	++	+	+	+/-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-9	Протвино	01.04.2014	Человек (операционная рана)		++	+	+	+/-	+/-

Примечание: АБП – антибактериальные препараты; AMP – ампициллин; AMC – амоксициллин-клавулановая кислота; AMS – ампициллин-сульбактам; CAZ – цефтазидим; CEF – цефоперазон; CPS – цефоперазон-сульбактам; CTX – цефотаксим; CTA – цефтриаксон; FEP – цефепим; AZR – азтреонам; IMI – имипенем; MER – меропенем; THR – триметоприм; PHO – фосфомицин; NIT – нитрофурантоин; TET – тетрациклин; CIP – ципрофлоксацин; CM – хлорамфеникол; TOB – тобрамицин; NET – нетилмицин; PIT – пиперациллин-тазобактам*.
*неопубликованные данные.

лекарственной устойчивостью. Средства распыляли механическим способом, дозированно, в присутствии людей, при разных интервалах, 2, 3 и 4 раза в день в зависимости от эпидемиологической обстановки (рис. 5). Ряд отдельных экспериментов, проведенных специалистами лабораторий ЛПУ противотуберкулезного профиля, выявил выраженную активность фитонцидов в отношении микроорганизмов сопутствующих инфекций, возникающих на фоне длительного применения лекарственных препаратов при лечении туберкулеза. Результаты исследования позволили рекомендовать средства в комплексной терапии, а также как метод ранней реабилитации больных туберкулезом [11, 12].

Также было выявлено, что средства на основе исследуемых фитонцидов подавляли рост бактерий II, III и IV групп патогенности, не влияя на рост лактобацилл, микрококков и бифидобактерий. На рис. 6 представлены фотографии чашек Петри с некоторыми культурами.

Аналогичные результаты представлены в отчетах Мицевич Е.В. и Мицевич И.П. при исследовательской работе со штаммами *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* ATCC 29923, *Legionella pneumophila*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* и *Micrococcus luteus*, полученных из рабочей коллекции лаборатории антимикробных препаратов, и Потапова В.Д. – при работе со штаммами *Salmonella* spp. и *E. coli*.

Было также установлено, что фитонциды из разных растений проявляют неодинаковую активность в отношении микроорганизмов III–IV групп патогенности. Средство на основе эфирных масел монарды и тагетеса (бархатцев) оказывало более выраженное действие на микобактерии и кишечную палочку, а композиция монарды с иссопом, при прочих равных ингредиентах рецептуры, проявляла более выраженную активность в отношении плесневых грибов и грибов рода *Candida*. Композиция с эфирами шалфея наиболее эффективна в отношении штаммов *L. pneumophila*, *N. meningitidis* сравнительно с предыдущими композициями (неопубликованные данные).

Установленные факты избирательной активности фитонцидов монарды коррелируют с данными профессора

Высочинной Г.И. с соавт., которым удалось вырастить культуру монарды в условиях Сибири и охарактеризовать ее вирулицидные, противомикробные и противопаразитарные свойства. В одном из сообщений об активности спиртовых экстрактов из монарды в отношении ряда микроорганизмов указывается на перспективность применения фитонцидов в условиях роста числа резистентных штаммов [13]. Очень ценные научные исследования и практические рекомендации доктора биологических наук Ткаченко Н.Н. по активности фитонцидов, выделенных из растений северных регионов России, в отношении бактерий, вирусов и грибов, в том числе вирусов гриппа [14], к сожалению, пока не нашли применения.

Отдельно был проведен сравнительный анализ средства на основе фитонцидов монарды и иссопа с антисептиком Мирамистин. Данные приведены в табл. 2.

Метод: спот, дата проведения 16.06.2017, ответственный исполнитель Мицевич И.П., руководитель Фурсова Н.К.

Сравнение показало более выраженную антибактериальную активность средства на основе фитонцидов в липосомах к шести видам микроорганизмов из тринадцати; к шести – активность была идентичной препарату сравнения, а рост *M. luteus* средство с фитонцидами не подавляло (неопубликованные данные).

По результатам этого двадцатилетнего проекта написаны статьи и оформлен ряд патентов, составлены научные отчеты и аналитические справки. Но нам удалось изучить только свойства фитонцидов некоторых растений: сосна и эвкалипт, бархатцы, одуванчик, василек, монарда, иссоп, шалфей, тимьян, душица, лаванда, нард. Патент РФ №2018115540 с приоритетом от 25 апреля 2018 г. в данный момент используется при производстве новых средств на основе фитонцидов отечественной компанией ООО «ЭРБИ».

Анализ патентной литературы в узком сегменте, только по растениям семейства губоцветных *Labiatae* (*Lamiaceae*) и сложноцветных *Compositae*, показал явный научный интерес к данному вопросу: 1 патент Германии; 2 европатента; 2 патента США; 1 заявка США; 5 опубликованных международных заявок PCT; 5 опубликованных заявок Кореи; 4 статьи в научных журналах. Известно применение одного или нескольких эфирных масел (более 20 по выбору) в композиции

Таблица 2. Сравнение активности средства с фитонцидами сосны, монарды, иссопа с антисептическим средством			
Исследуемый микроорганизм	«МОНАРИС» Мирамистин 0,01% Сравнение (191115)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29923	Без разведения 1 разведение	Без разведения 1 разведение	идентично
<i>Streptococcus pneumonia</i> ATCC	Без разведения	Без разведения	идентично
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Без разведения 1 разведение	Без разведения 1 разведение	идентично
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	Без разведения 1 разведение	Без разведения	+
<i>Candida albicans</i>	Без разведения 1 разведение	Без разведения	+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Без разведения 1 разведение	Не работает	+++
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Без разведения 1 разведение	Без разведения 1 разведение	идентично
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 7973	Без разведения 1 разведение	Без разведения 1 разведение	идентично
<i>Haemophilus influenzae</i>	Без разведения 1 разведение 2 разведения	Не работает	++++
<i>Neisseria meningitidis</i> типА	Без разведения 1 разведение 2 разведения	Без разведения	++
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Без разведения; 1 разведение	Без разведения 1 разведение	идентично
<i>Micrococcus luteus</i>	Не работает	Без разведения 1 разведение	Не влияет
<i>Moraxella chataralis</i>	Без разведения 1 разведение 2 разведения	Без разведения 1 разведение	+++

Использовалась методика для проверки антибактериальных веществ (общепринятая): исследуемый штамм микроорганизма в концентрации 0,5 единиц оптической плотности по DensiLaMetr (Чехия) в объеме 100 мкл высевали на чашку Петри с соответствующей питательной средой. Исследуемое вещество титровали последовательным 2-кратным разведением в пробирках (1:1 препарат:стерильная дистиллированная вода) до 8-го разведения и наносили по 10 мкл на газон с соответствующей культурой. Инкубацию проводили при 37°C в течение 24 ч. Срок годности веществ: до 08.2018 и 12.2018 соответственно

для лечения вирусных, грибковых и паразитарных инфекций, кистозного фиброза и СПИД, которые подходят для терапевтического использования (патент Франции FR2830198A1). Многими авторами, как и нами, используется сочетание эфирных масел с экстрактами растений с учетом их взаимоусиливающего действия. Липосомы же чаще применяются при получении лекарственных препаратов, что обусловлено сложностью технологий их получения.

К сожалению, вопросы формирования здоровой среды обитания – окружающей среды человека, обусловленной совокупностью факторов (физических, химических, биологических, информационных, социальных), способных оказывать прямое или косвенное, немедленное или отдаленное воздействие на жизнедеятельность человека, – вызвали интерес только в последние 3–4 года в узких кругах.



Рис. 5. Установка приборов и контрольный отбор проб в помещениях объектов.

Заключение

Итак, научно доказано, что фитонциды можно активно применять в отношении ряда микроорганизмов, в том числе резистентных штаммов. Наиболее выраженный эффект обеспечивают фитоизвлечения, где присутствует от 10 до 40% терпеноидов, например таких, как пинен, тимол, карвакрол, оцимен и цитраль. Они в больших количествах содержатся в эфирных маслах монарды, душицы (ориганум), тимьяна, иссопа, сосны, эвкалипта, тысячелистника и других растениях, которые были выбраны нами по рекомендациям Николаевского и Блохиной или в соответствии с данными справочников по фитотерапии. Смолы, к сожалению, используются еще реже, несмотря на то, что их можно легко экстрагировать из коры многих деревьев регионов России и трав, произрастающих на нашей территории.

Фитонциды сосны широко применяются в курортологии для реабилитации больных бронхолегочными заболеваниями. Шалфей, эвкалипт, монарда, маклея и многие другие растения известны своими противовирусными свойствами. На основе экстрактов растений созданы медицинские препараты, но многие лекарственные растения неоправданно забыты. У Амасиаци есть указания на применение таких трав, как шалфей, донник, иссоп, тимьян, можжевельник, при инфекционных и аллергических болезнях, и мне было приятно, что мы выбрали эти растения еще до того, как нам в руки попала эта удивительная книга армянского врача.

Преимущества фитонцидов в том, что растения синтезируют их для защиты от атаки микроорганизмов в данный момент времени и в данной экологической обстановке, т.е. к актуальным штаммам микроорганизмов. Известно, что для каждого вида в природе существует свой биологический ограничитель, причем их, как правило, несколько. Их целенаправленное применение очень перспективно, особенно с учетом того, что они не затрагивают микробиом человека, животных, растений.

В настоящий момент человечество столкнулось с коронавирусом nCoV-2019. Наблюдения за развитием событий в разных странах в который раз вызывают желание обратить внимание медиков и бактериологов на огромный накопленный опыт в области фитотерапии. Ведь несмотря на современные технологии и огромное количество лекарственных

препаратов и дезинфицирующих средств, эпидемия превратилась в пандемию. Основная нагрузка в противостоянии распространению инфекции, как и прежде, ложится на плечи эпидемиологов. Поэтому актуальным становятся опыт тех, кто боролся с инфекциями, не имея современных средств. И особо важными являются меры профилактики и соблюдение установленных санитарных правил, как это делал лекарь Самойлович, спасая Москву от эпидемии чумы с помощью фитонцидов из березы и сосны. От физической перегрузки при лечении огромного числа людей он тоже переболел чумой, но выздоровел и смог передать свой опыт последующим поколениям. И им надо воспользоваться.

Наши достижения – это успех наших учителей, труд которых мы продолжили. Фитонциды, которые обладают способностью подавлять рост бактерий, вирусов, грибов и паразитов или полностью их уничтожить, изучением свойств которых занимались многие ученые во все времена, опять в центре внимания. В истории нашего проекта было много разных событий и участвовало много разных специалистов. Многих из них уже с нами нет – это Блохина И.Н., Николаевский В.Н., Боровик Р.В., Тарумов В.С., Мицевич Е.В., Корнилова З.Х., Рудаков И.А., Бельфер А.Г., но мы пользуемся их опытом, знаниями и наставлениями.

Список литературы в данной статье представляет ряд моих работ, работ моих учителей и результаты тех достижений, которые мы получили в процессе развития проекта по применению фитонцидов для улучшения условий труда и снижения риска возникновения воздушно-капельных инфекций [10].

Совместно со специалистами МСЧ №164 ФМБА мы смогли провести ряд широкомасштабных исследований и осуществить грамотный анализ проб воздуха многих объектов, где нет собственных микробиологических лабораторий. Многие исследования были проведены благодаря финансовой и идеологической поддержке Зурабова А.Ю. Энергичный характер и практический опыт в области медицины Петрова Т.В. (генерального директора ООО «ЭРБИ») наконец обеспечили возможность автоматизированного применения фитонцидов. Личное участие Чубатовой О.И. и совместные усилия в производстве сложных расчетов по активным дозам фитонцидов на большие объемы воздуш-



Рис. 6. Определение активности средств с фитонцидами сосны и разными композициями эфирных масел на культуры микроорганизмов: слева направо – *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Lactobacillum* ssp. На чашках четко видны зоны подавления роста микроорганизмов в местах нанесения средств на основе разных композиций фитонцидов*.

*неопубликованные данные.

ного пространства и установке приборов в нужной локации позволили написать инструкции по применению новой технологии.

Данные по эффективности технологии при разных методах ее использования на объектах Москвы и других городов уже опубликованы [15], а некоторые, с участием молодых ученых, будут представлены в последующих публикациях.

Применение фитонцидов, несомненно, перспективное направление, особенно с учетом опыта тех, кто уже на протяжении многих лет использует фитонциды на практике, обеспечивая снижение заболеваемости в своих трудовых коллективах.

Благодарности

Я выражаю огромную благодарность за оказанную помощь и поддержку в проведении исследований д.м.н. Подольскому В.С., Ивашову С.В., Клуниковой Н.М. из Протвинской городской больницы, самого первого «полевого опыта», д.м.н. Косяковой Н.И. (Пущинский медицинский центр), д.м.н. Грудянову А.И., д.м.н. Орловой О.А. (ЦНИИС ЧХЛ), к.х.н. Чиркову Н.А. (МГУ ДТ), заслуженному учителю РФ Лысыкову А.И. (Серпуховский Губернский колледж), Федотову А.В., заместителю административного директора, главному инженеру АО «Северсталь Менеджмент», Обуховой Т.С. менеджеру службы эксплуатации АО «Северсталь Менеджмент», и всем активным сторонникам нашего проекта.

Литература

- Амасаици Амирдовлад. Ненужное для неучей. М.: Наука; 1990. 878 с.
- Николаевский ВН. Справочник ароматерапии. М., 2001. 342 с.
- Чубатова СА, Желудева ИВ, Михайлова ЕГ. Липосомы и бактериофаги в пародонтологии. М.-Н.Н.: 2001, 86 с.
- Ивашов СВ, Михайлова ЕГ, Борзенкова ТХ, Вострокнутова ГН, Негрий НВ, Ступин АЮ, и др. Оценка антимикробной активности липосомированных экстрактов некоторых видов растений для обработки воздуха помещений. Растительные ресурсы. 2012;48(1):127-137.
- Михайлова ЕГ, Копецкий ИС, Чубатова ОИ. Эффективность применения средств на основе природных антисептиков в медицинских учреждениях. Медицинский вестник МВД. 2012;3(58):51-5.
- Михайлова ЕГ, Чубатова СА, Селезнева ТА. Оптимизация условий труда в стоматологических центрах. Стоматологический научно-образовательный журнал. 2014;3/4.
- Овчинников ВГ, Сентябрев НН, Чубатова ОИ, Камчатников АГ, Ракова ЕВ, Щедрина ЕВ. Экспериментальное обоснование принципов составления композиций эфирных масел. Современные проблемы науки и образования. 2014;2:501.
- Потапов ВД, Чубатова ОИ, Шрамко ПА, и др. Арогенный способ применения средств на основе липосом. Материалы конференции «Высокие технологии XXI века». М., апрель 18-21, 2011.
- Патент РФ №2452470 МПК7 Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00, опубл. 10.06.2012, Бюл. №23(11).
- Potapov V, Chubatova O, Chubatova S, Bakhteeva I, Titareva G. Mix of Phytoncides Enclosed in Liposomes Protects Mice against TB Infection. Poster F1-1361 on the 51th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL, USA, September 17-20, 2011.
- Михайлова ИВ, Чёрный ЕВ, Корнилова ЗХ, Чубатова ОИ, Потапов ВД, Угодчиков ГА, Чубатова СА. Новое направление в области профилактики туберкулеза. Безопасность жизнедеятельности. 2013;5(149):2-8.
- Михайлова ИВ, Чёрный ЕВ, Корнилова ЗХ, и др. Инновации в области профилактики туберкулеза. 21-й век: фундаментальная наука и технологии. 2014;111(3):56-68.
- Ткаченко КГ, Платонов ВГ, Сацыперова ИФ. Антивирусная и антибактериальная активность эфирных масел из плодов видов рода *Heracleum L. (Apiaceae)*. Растительные ресурсы. 1995;31(1):9-19.
- Ткаченко КГ, Платонов ВГ, Сацыперова ИФ. Способ получения вещества, обладающего противогриппозной активностью. Авторское свидетельство №1501339. Заявка №3881163, приоритет 08.04.1985. Зарегистрировано 15.04.1985. 85.
- Чубатова ОИ, Михайлова ЕГ, Скрипникова ЕВ, Доброхотский ОН, Борзенкова ТХ, Негрий НВ. Способ снижения риска передачи воздушно-капельных инфекций посредством обработки воздуха помещений. Бактериология. 2019;4(3):38-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-38-43

References

- Amasiatsi Amirdovlad. Nenuzhnoe dlya neuchei. Moscow: "Nauka" Publ.; 1990, 878 p. (In Russian).
- Nikolaevskii VN. Spravochnik aromaterapii. Moscow, 2001, 342 p. (In Russian).
- Chubatova SA, Zheludeva IV, Mikhailova EG. Liposomy i bakteriofagi v parodontologii. Moscow, Nizhny Novgorod, 2001, 86 p. (In Russian).
- Ivashov SV, Mikhailova EG, Borzenkova TKh, Vostroknutova GN, Negrii NV, Stupin AYu, et al. Estimation of antimicrobial activity of liposomal extracts of some plant species for room air treatment. Rastitelnye Resursy. 2012;48(1):127-137. (In Russian).
- Mikhailova E, Kopetsky I, Chubatova O. Effectiveness of application of natural antiseptic-based remedies in health care institutions. MIA Medical Bulletin. 2012;3(58):51-5. (In Russian).
- Mikhailova EG, Chubatova SA, Selezneva TA. Optimizatsiya uslovii truda v stomatologicheskikh tsentrakh. Stomatologicheskii nauchno-obrazovatel'nyi zhurnal. 2014;3/4. (In Russian).
- Ovchinnikov VG, Sentyabrev NN, Chubatova OI, Kamchatnikov AG, Rakova EV, Schedrina EV. Experimental basis of the principles of composition of essential oils. Modern Problems of Science and Education. 2014;2:501. (In Russian).
- Potapov VD, Chubatova OI, Shramko PA, et al. Aerogenic method of application of liposome-based products. Proceedings of the conference "High technologies of the XXI century". Moscow, April 18-21, 2011. (In Russian).
- Patent of the Russian Federation No 2452470 MPK7 N 04 B 1/38, N 04 J 13/00, publ. 10.06.2012, Bul. No 23 (11). (In Russian).
- Potapov V, Chubatova O, Chubatova S, Bakhteeva I, Titareva G. Mix of Phytoncides Enclosed in Liposomes Protects Mice against TB Infection. Poster F1-1361 on the 51th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL, USA, September 17-20, 2011.
- Mikhailova IV, Cherniy EV, Kornilova ZKh, Chubatova OI, Potapov VD, Ugodchikov GA, Chubatova SA. New trend in tuberculosis prevention. Life Safety (Bezopasnost' Zhiznedeatel'nosti). 2013;5(149):2-8. (In Russian).
- Mikhailova IV, Cherniy EV, Kornilova ZKh, et al. Innovatsii v oblasti profilaktiki tuberkuleza. XXI century: fundamental science and technology. 2014;111(3):56-68. (In Russian).
- Tkachenko KG, Platonov VG, Satsyperova IF. Antivirusnaya i antibakterial'naya aktivnost' efirnykh masel iz plodov vidov roda *Heracleum L. (Apiaceae)*. Rastitelnye Resursy. 1995;31(1):9-19. (In Russian).
- Tkachenko KG, Platonov VG, Satsyperova IF. Method for obtaining a substance with anti-influenza activity. Author's certificate no. 1501339. Application no. 3881163, Priority 08.04.1985 Registered 15.04.1985. 85. (In Russian).
- Chubatova OI, Mikhaylova EG, Skripnikova EV, Dobrokhotsky ON, Borzenkova TH, Negriy NV. A method for reducing the risk of transmission of airborne infections through indoor air treatment. Bacteriology. 2019; 4(3): 38-43. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-38-43 (In Russian).

Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

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

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

Требования к оформлению статьи.

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

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

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org