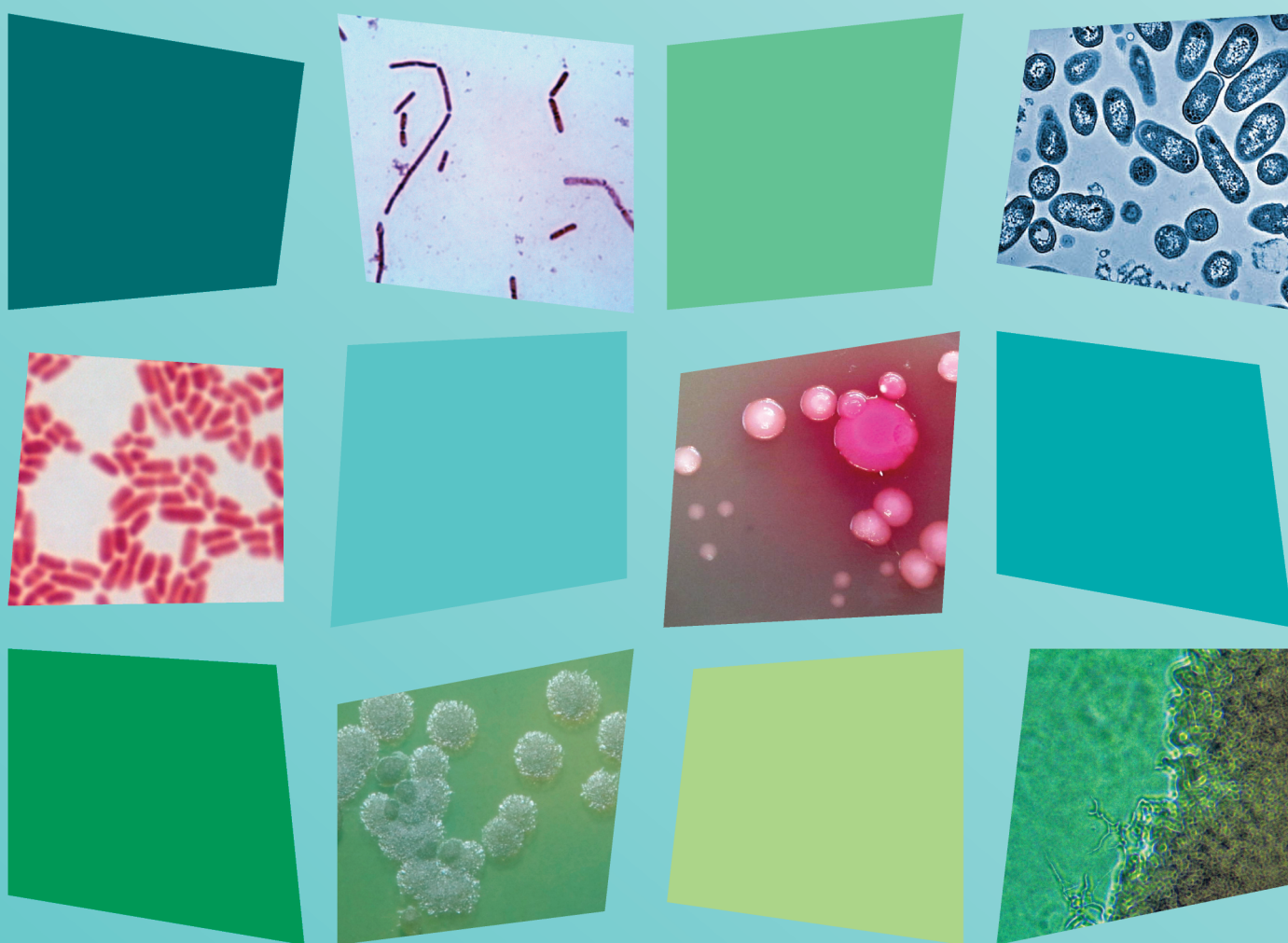


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2020 • ТОМ 5 • №4

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

Адьяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)	С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, проф. (США)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)	Т.В.Припутневич, д.м.н. (Россия)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	А.Ракин (Германия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
М.Косой, к.б.н. (США)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)	

Учредитель

© Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
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 25.12.2020 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

- О результатах научно-исследовательских работ в области бактериологических исследований, полученных в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)» 5

Экспериментальные статьи

- Опасность сибиреязвенных почвенных очагов при проведении земляных работ
И.А.Дятлов, Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, Е.А.Тюрин 12
- Получение и определение концентрации в культуральной жидкости фаэцина – пептидного бактериоцина
Enterococcus faecium
В.М.Борзенков, В.П.Левчук, В.И.Суровцев 20
- Пути решения проблем выделения протеев в ветеринарии
А.А.Кремлева, Ю.А.Скоморина, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин 25
- Роль дождевых червей в распространении сибирской язвы
Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов 30
- Получение кроличьих гипериммунных сывороток к *Haemophilus influenzae*
Я.Б.Нескородов, Я.В.Мишуткина, С.Г.Марданлы 35

Обзорные статьи

- Адгезины патогенных иерсиний
А.С.Трунякова, А.С.Вагайская, С.В.Дентовская 39
- Экспрессные методы при исследовании пищевых продуктов
Л.А.Краева, Е.В.Смирнова, И.А.Деревянченко 52
- Обеспечение требований биологической безопасности при проведении биотехнологических процессов с микроорганизмами I–IV групп патогенности
Е.А.Тюрин, Л.В.Чекан 60

Памяти коллеги

- Владимир Ашотович Давидянц 65
- Правила оформления статей (основные положения) 66

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

- On the results bacteriological research, received under the Federal Target Program
"National System of Chemical and Biological Safety of the Russian Federation (2015-2020)" 5

Experimental Articles

- The danger of anthrax soil foci during excavation
I.A.Dyatlov, L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, E.A.Tyurin 12
- Obtaining and determination of the concentration in the culture fluid of phaecin – peptide bacteriocin *Enterococcus faecium*
V.M.Borzenkov, V.P.Levchuk, V.I.Surovtsev 20
- Ways to solve problems of *Proteus* isolation in veterinary medicine
A.A.Kremleva, Yu.A.Skomorina, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin 25
- The role of earthworms in the spread of anthrax
L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov 30
- Obtaining bunny hyperimmune serum for *Haemophilus influenzae*
Ya.B.Neskorodov, Ya.V.Mishutkina, S.G.Mardanly 35

Review Articles

- Adhesins of pathogenic *Yersinia*
A.S.Trunyakova, A.S.Vagaikskaya, S.V.Dentovskaya 39
- Rapid methods in the study of food
L.A.Kraeva, E.V.Smirnova, I.A.Derevyanchenko 52
- Ensuring biological safety requirements when carrying out biotechnological processes
with microorganisms of I–IV pathogenicity groups
E.A.Tyurin, L.V.Chekan 60

Obituary

- Vladimir A. Davidyants 65

- Instructions for Authors 66

О результатах научно-исследовательских работ в области бактериологических исследований, полученных в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)»

В реализации данной части программы принимали участие: ФБУН ГНЦ ПМБ (координатор НИОКР среди НИИ Роспотребнадзора), ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, ФБУН НИИЭМ им. Пастера, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (вирусологические исследования), ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной.



Данное сообщение посвящено анализу выполненных научно-исследовательских работ в области бактериологии, в основном особо опасных и социально значимых инфекций. Результаты распределены по направлениям, обозначенным в Федеральной целевой программе.

Разработка и оптимизация средств и методов идентификации и дифференциации возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) на основе данных о разнообразии геномов

В рамках данной тематики с помощью биоинформационных баз данных и программ проанализирована информация об особенностях нуклеотидных последовательностей штаммов и видов целевых микроорганизмов. В результате работы подобраны специфичные для возбудителей чумы, холеры, легионеллеза, сапа, мелиоидоза, бруцеллеза ДНК-мишени, олигонуклеотидные праймеры и зонды, которые использованы для разработки методов их выявления, генетического типирования и дифференциации, а именно: проведены подбор и оптимизация компонентов и условий для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в формате биочипа (МЛ ПЦР-Чип); выбраны 12 хромосомных и плазмидных ДНК-мишеней (локусы *Za*, *yihN*, *pla*, *caf1*, *irp2*, *hmsH*, *lcrV*, *45*, *89*, *Med(-24)*, *Med(-70)*, *glpD(-93)*, *Pro*, *Phage*), рассчитаны праймеры для них, оптимизированы слайды для иммобилизации зондов, буферы для печати и гибридизации; эффективность компонентов подтверждена на 22 штаммах основного и неосновного подвидов; проведены подбор и оптимизация компонентов (в частности, праймеров и зондов к ДНК-мишеням *lolB*, *wbeN*, *wbfR*, а также *seqY*, *hlyA*) для выявления и дифференциации возбудителей холеры и актуальных острых кишечных инфекций, в частности сальмонеллезов и кампилобактериозов, путем амплификации нуклеиновых кислот, включая мультилокусный формат; проведены подбор и оптимизация компонентов и условий для ге-

нетического типирования штаммов возбудителя чумы методом мультилокусного VNTR-анализа на 15 локусах; подобраны компоненты (в частности, праймеры и зонды к ДНК-мишеням *sdhA*, *ftsZ*, *16SrDNA*, а также *dotA*, *lvrA(lvhD)*) и оптимизированы условия для выявления и дифференциации легионелл методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР РВ); на основе анализа геномных последовательностей 86 штаммов *Burkholderia pseudomallei* сформированы схемы *sg/wg* MLST для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза методом фрагментного анализа; подобраны и получены компоненты (в частности, праймеры и зонды к ДНК-мишеням *bcsrp31*(*Brucella*), *BMEI10847*(*melitensis*), *sodA*, *smc(abortus)*) и оптимизированы условия для генетического типирования штаммов возбудителя бруцеллеза путем амплификации целевых локусов INDEL и VNTR.

В ходе выполнения данной НИОКР на основании данных полногеномного секвенирования адаптированы для эффективного генотипирования возбудителей ООИ методы фрагментного анализа нуклеиновых кислот, что позволит проводить на новом уровне точности их внутривидовую дифференциацию.

Новые данные о генетическом разнообразии патогенных микроорганизмов на клональном, штаммовом и видовом уровнях могут быть использованы для оценки рисков возникновения вспышек инфекций в рамках деятельности по контролю за инфекционными заболеваниями.

Разработка линейки тест-систем лабораторного и полевого применения для экспресс-диагностики инфекций, вызываемых патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп патогенности, с использованием гено- и иммунодиагностических технологических платформ

В рамках данной темы проведены выбор, получение и оптимизация компонентов и условий: для выявления возбудителя Ку-лихорадки в тесте ПЦР; для выявления возбудителя Ку-лихорадки в иммуноферментном анализе (ИФА); для выявления антител к возбудителю туляремии в иммунохроматографическом анализе. Оформлены соответствующие протоколы.

Выполнены конструирование и опытно-экспериментальные исследования компонентов пробоподготовки для одновременного выявления 5 возбудителей особо опасных бактериальных патогенов с использованием реакции петлевой изотермической амплификации (LAMP). Получен и оптимизирован набор компонентов пробоподготовки на наноманитных частицах (НМЧ) для LAMP-тестов, исследована эффективность использования пробоподготовки на НМЧ для LAMP-тестов на возбудителей ООИ. Проведены выбор и получение антигенных компонентов мультиплексных иммуночипов для быстрого обнаружения антител к вирусам I–II групп патогенности: сравнительный анализ антигенов филовирусов с целью выявления видоспецифических фрагментов.

С помощью биоинформационных баз данных и программ проанализирована имеющаяся информация об особенностях генома *Coxiella burnetii* и выявлены высокоспецифичные консенсусные участки генетических мишеней, для амплификации которых сконструированы системы олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов. На их основе разработан диагностический ПЦР-тест для выявления *C. burnetii*. Получен антиген *C. burnetii*, применение которого обеспечивает специфическую активность разрабатываемого диагностического ИФА-теста для выявления антител к *C. burnetii*. Подобраны специфичные компоненты иммунохроматографического теста для выявления антител к возбудителю туляремии. Сконструированы компоненты наборов пробоподготовки с использованием НМЧ для одновременного выявления 5 возбудителей ООИ в реакции LAMP. Для разработки диагностической системы, предназначенной для выявления антител к возбудителям вирусных заболеваний I–II групп патогенности, проведен анализ литературных данных о потенциальных белковых вирусных антигенах. Оценена диагностическая ценность различных вирусных антигенов, для наиболее перспективных проведена оптимизация нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов под конкретные системы экспрессии, а также получены генетические конструкции, содержащие фрагменты ДНК, кодирующие целевые белки.

Впервые получены новые данные о возможностях экспресс-диагностики ООИ по генетическим и иммунологическим маркерам. Разработаны диагностические тест-системы на основе ПЦР РВ для выявления *C. burnetii*, ИФА – для серодиагностики Ку-лихорадки, иммунохроматографии – для серодиагностики туляремии. Показана возможность эффективного использования пробоподготовки на НМЧ для одновременного выявления возбудителей ООИ методом LAMP.

Разработка и внедрение в медицинскую практику современных методов, обладающих высокой информативностью и производительностью для осуществления одновременной диагностики целого ряда инфекционных заболеваний, позволит повысить качество и доступность диагностических услуг населению, будет способствовать росту уровня отечественного здравоохранения в целом. Применение результатов данной работы позволит проводить раннее диагностирование инфекционных заболеваний, предотвращая угрозу их распространения.

Совершенствование нормативно-методической базы процедуры депонирования штаммов патогенных микроорганизмов, клеточных культур и результатов их исследований в Государственных коллекциях Роспотребнадзора

При выполнении работ по данной тематике на основе выбранного программного обеспечения создана структура информационного банка данных результатов научных исследований штаммов патогенных микроорганизмов и клеточных культур в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора. Подготовлен проект методических рекомендаций «Порядок организации и управление информационным банком данных результатов научных исследований штаммов патогенных микроорганизмов и клеточных культур в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора».

Определены современные методические подходы к идентификации и установлению аутентичности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и клеточных культур в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора; подготовлена аналитическая справка. Выполнено формирование базы данных результатов научных исследований штаммов патогенных микроорганизмов и клеточных культур из Государственных коллекций патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора. Оформлены паспорта коллекционных штаммов бактерий и вирусов I–II групп патогенности и клеточных культур.

Разработка методологии идентификации возбудителей особо опасных инфекций в биологическом материале, содержащем смесь патогенных биологических агентов

В рамках данной тематики созданы 3 базы данных, включающие характерные варианты последовательностей ДНК *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* и *Vibrio cholerae*. Создана программа MetaAnalyzer 2.0 для работы с базой данных характерных вариантов последовательностей ДНК *V. cholerae*.

Разработаны методические рекомендации «Алгоритм анализа метагеномных данных, позволяющего выявлять в сложных образцах присутствие ДНК *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*» учрежденческого уровня. Получены протоколы создания сложных модельных образцов с концентрациями ДНК *B. anthracis*, *F. tularensis* и *V. cholerae* менее 1% от ДНК других микроорганизмов и протоколы оценки эффективности обнаружения в сложных образцах присутствия ДНК *B. anthracis*, *F. tularensis* и *V. cholerae*, а также протоколы создания сложных модельных образцов, содержащих ДНК возбудителей кишечных инфекций II–IV групп патогенности (возбудители холеры, возбудители эшерихиозов, стафилококки, листерии, клостридии, сальмонеллы, патогенные вирусы), и соответствующие протоколы оценки эффективности обнаружения в сложных образцах присутствия ДНК возбудителей инфекций II–V групп патогенности. Подготовлена аналитическая справка «Особенности анализа метагеномных образцов, содержащих новые и редкие возбудители инфекционных заболеваний».

В результате выполненного исследования созданы и представлены 3 базы данных (электронные варианты): база данных, включающая характерные варианты последовательностей ДНК *Burkholderia* spp.; база данных, включающая характерные варианты последовательностей ДНК *Brucella* spp.; база данных, включающая характерные варианты последовательностей нуклеиновых кислот, характерных для патогенных вирусов. Разработана модельная система, позволяющая оценить эффективность обнаружения в сложных образцах присутствия нуклеиновых кислот, принадлежащих *Burkholderia* spp., *Brucella* spp., патогенным вирусам.

Проведен анализ геномов штаммов ПБА I–II групп бактериальной и вирусной этиологии, представляющих наибольшую актуальность для обеспечения биологической безопасности. Создана база данных, включающая характерные варианты последовательностей нуклеиновых кислот различных ПБА I–II групп бактериальной и вирусной природы, предназначенная для идентификации ПБА I–II групп бактериальной и вирусной этиологии, представляющих наибольшую актуальность для обеспечения биологической безопасности.

Осуществлен выбор параметров для картирования данных метагеномных исследований, направленных на исследование образцов, подозрительных на наличие патогенов бактериальной либо вирусной природы с известной таксономической принадлежностью; универсальных параметров для картирования данных высокопроизводительного секвенирования, полученных при исследовании образцов, содержащих возбудителей инфекционных заболеваний неясной этиологии; критериев оценки достоверности обнаружения в исследуемых образцах присутствия возбудителей инфекционных заболеваний, наиболее актуальных для обеспечения биологической безопасности.

Создание новой технологической платформы для получения нативных человеческих терапевтических моноклональных антител (МКА) к опасным токсинам и особо опасным инфекциям бактериальной и вирусной природы

При выполнении работ по данной тематике проведено определение иммунного статуса добровольцев, вакцинированных против сибирской язвы и клещевого энцефалита, для выбора доноров иммунокомпетентных клеток с целью последующего слияния. Проанализированы сыворотки крови 28 доноров, иммунизированных против клещевого энцефалита, и 10 доноров, иммунизированных против сибирской язвы, на взаимодействие с вирусом клещевого энцефалита и компонентами летального токсина соответственно. Оформлен протокол исследований.

Отработана технология получения гетерогридом человек–мышь. Для проведения экспериментов по слиянию и получению гибридных клонов отобраны образцы сывороток крови 12 добровольцев, вакцинированных против клещевого энцефалита, с титрами антител IgG от 1:1600 до 1:200, и 4 добровольцев, вакцинированных против сибиреязвенной инфекции. С использованием методологии клеточного сортирования для отбора плазмобластов, технологий розеттинга, иммортализации вирусом Эпштейна–Барр и процедуры электрослияния было проведено конструирование гетерогридом человек–мышь. Оформлены паспорта гетерогридом – продуцентов нативных человеческих МКА.

Проведен отбор специфических клонов терапевтических МКА к протективному антигену и летальному фактору летального токсина сибирской язвы и антигенным белкам вируса клещевого энцефалита. Оформлен протокол селекции клонов-продуцентов. Проведен скрининг продуцентов нативных человеческих МКА. Из 29 криоконсервированных клонов тригибридом на основании данных ИФА и токсиннейтрализующей активности клонов МКА в *in vitro* тесте против летального токсина *B. anthracis* и против вируса клещевого энцефалита выбрано 19 стабильных клонов продуцентов МКА. Получены рекомбинантные белки к III и IV доменам протективного антигена возбудителя сибирской язвы. Определена специфическая активность клонов МКА в отношении компонентов летального токсина – полноразмерных рГА и рЛФ *B. anthracis*, а также доменная специфичность МКА против III и IV доменов рГА. Синтезируемые клонами МКА охарактеризованы по классовой принадлежности и аффинности. Подобраны и описаны оптимальные условия культивирования тригибридных клеточных линий продуцентов МКА, позволяющих получить высокие показатели продукции нативных человеческих терапевтических антител. На основании оптимизации условий культивирования разработан протокол продукции МКА тригибридными клеточными линиями в динамическом режиме.

Разработаны технология пилотного культивирования гибридных клонов и выделения нейтрализующих человеческих моноклональных антител из культуральной жидкости и технология очистки нейтрализующих человеческих МКА методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Оформлен протокол выделения и очистки токсин-нейтрализующих человеческих антител и человеческих антител, нейтрализующих вирус клещевого энцефалита. Исследованы способность нейтрализации человеческими МКА действия летального токсина на мышах линии BALB/c и способность нейтрализации человеческими МКА вируса клещевого энцефалита на беспородных мышах.

Оформлены: протокол исследований по нейтрализации инфекции клещевого энцефалита с помощью человеческих МКА на модели мышей; протокол исследований по нейтрализации действия летального токсина с помощью человеческих МКА на модели мышей линии BALB/c; паспорта клонов, обладающих высокоэффективной продукцией антител, специфически нейтрализующих действие сибиреязвенного токсина и вируса клещевого энцефалита *in vivo*.

В рамках выполнения НИР предложено техническое решение для создания экономически эффективного способа получения панелей полностью человеческих МКА к антигенам патогенных бактерий и вирусов. Использование мышинных моделей позволяет выбрать тригибри-

домы, синтезирующие антитела с высокой токсиннейтрализующей активностью в отношении сибиреязвенного токсина и вируса клещевого энцефалита. Оптимизация культивирования тригибридом с использованием микроносителя в среде культивирования позволяет увеличить выход продукта в 2,5 раза.

В продолжение предыдущей тематики были выполнены исследования в рамках НИОКР «Разработка технологии получения очищенных терапевтических моноклональных антител человека», в рамках которой получены и очищены методами хроматографии рекомбинантные полноразмерные протективный антиген и летальный фактор *B. anthracis*, а также их домены. Получены меченые флюоресцентным красителем рекомбинантные протективный антиген и летальный фактор *B. anthracis*.

Получены данные об уровне антител, специфичных к протективному антигену *B. anthracis*, в сыворотках крови доноров, иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой, токсиннейтрализующей активности исследуемых сывороток в отношении летального токсина *B. anthracis*, на основании которых будут выбраны доноры для получения плазмобластов. Отработана методология стерильного сортирования плазмобластов в щадящем для клеток режиме. Проведены фенотипирование и селекция единичных плазмобластов, специфических к протективному антигену возбудителя сибирской язвы из популяции В-лимфоцитов, полученных методом негативной селекции.

В результате выполненных работ оптимизирована технология селекции единичных плазмобластов человека из крови вакцинированных против сибирской язвы доноров. Ключевыми элементами технологии являются: 1) селективное выделение В-лимфоцитов в жидкой фазе из образцов крови; 2) фенотипирование плазмобластов в крови вакцинированных доноров; 3) оптимизация условий единичного сортирования плазмобластов. Оформлен протокол селекции специфических плазмобластов против инфекционных агентов на примере *B. anthracis*.

В рамках выполнения НИР предложено техническое решение для создания экономически эффективного способа получения последовательностей, кодирующих вариabельные участки специфически активных иммуноглобулинов человека с целью их дальнейшего использования для получения человеческих МКА. На основании фенотипических характеристик В-лимфоцитов предложено проводить единичный сортирование плазмобластов методом проточной цитометрии. Для получения В-лимфоцитов используют кровь доноров на 6–7-е сутки после иммунизации вакциной сухой сибиреязвенной живой. Применение единичного сортирования плазмобластов значительно упрощает дальнейшее получение и селекцию экспрессионных векторов.

Таким образом, разработана высокочувствительная экспресс-система скрининга и сортирования специфических плазмобластов (препродуцентов антител), основанная на селекции клеток, экспрессирующих маркеры плазмобластов и антитела к протективному антигену *B. anthracis*. Данный метод позволит получить специфические плазмобласты в течение 4 ч. Оптимизированная технология может быть использована в дальнейшем при конструировании человеческих и химерных МКА.

Получены данные о технологии клонирования последовательностей, кодирующих вариabельные части человеческого иммуноглобулина G, из одной клетки-плазмобласта, создания вектора, оптимизации условий трансфекции и культивирования клеток-продуцентов с последующей очисткой моноклональных антител методами ВЭЖХ.

Проведено определение первичной структуры специфических человеческих антител. В составе промежуточного отчета представлено описание последовательностей кДНК, кодирующей синтез IgG, специфических к токсину *B. anthracis*. Осуществлена оптимизация процесса синтеза терапевтических МКА человека. Оформлен «Лабораторный регламент наработки терапевтических моноклональных антител человека ЛР 78095326-224-2019».

Проведена оптимизация процесса выделения терапевтических МКА человека. Оформлен «Лабораторный регламент хроматографического выделения терапевтических моноклональных антител человека ЛР 78095326-225-2019».

Проанализирована токсиннейтрализующая активность МКА в системе *in vitro* с использованием перевиваемой макрофагоподобной клеточной линии J774A.1. В мышинной модельной системе проведена оценка нейтрализующей активности МКА против летального токсина сибиреязвенного микроба. Данные о токсиннейтрализующей активности МКА в отношении сибиреязвенного токсина в системе *in vitro* на перевиваемой клеточной линии J774A.1 и в системе *in vivo* на мышах представлены в виде раздела в составе отчета.

На основании данных о токсиннейтрализующей активности антител выбраны наиболее эффективные клоны-продуценты. Нарботано два образца человеческих МКА, оформлены акт наработки и паспорта.

Использование современных омиксных и генно-инженерных технологий для характеристики фондовых культур бактерий и вирусов из состава Государственных коллекций патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора

В рамках данной тематики проведена разработка технологии определения полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид у штаммов *Yersinia pestis*. Выполнено гибридное секвенирование трех штаммов чумного микроба с использованием технологий мономолекулярного гибридного секвенирования (MinION) и секвенирования путем синтеза (Illumina). Показана высокая эффективность совместного использования данных молекулярного нанопорового секвенирования и данных, полученных при секвенировании посредством синтеза, для реконструкции последовательностей бактериальной хромосомы. Представлены: протоколы гибридного секвенирования штаммов *Y. pestis*; протоколы реконструкции полных последовательностей хромосом и плазмид штаммов *Y. pestis*.

Выполнено полногеномное секвенирование 25 штаммов бактерий I–II группы патогенности и 10 штаммов вирусов из коллекционных фондов Государственных коллекций патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора. Представлены полученные в результате секвенирования паспорта геномных последовательностей 10 штаммов патогенных вирусов и 25 патогенных бактерий; полный набор нуклеотидных последовательностей 25 штаммов патогенных бактерий в формате FASTQ; полный набор нуклеотидных последовательностей 10 штаммов вирусов в формате FASTA.

Проведена разработка прототипа интерактивного каталога штаммов микроорганизмов, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора. Проект интерактивного каталога штаммов микроорганизмов из Государственных коллекций патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора представлен в составе отчета. Для совершенствования учета штаммов, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора, подготовлен проект регистрации и алгоритм обработки запросов для создания интерактивного каталога. Разработан проект интерфейса интерактивного электронного каталога.

Проведена разработка технологии определения полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид у штаммов *Y. pestis*, *B. anthracis*, *F. tularensis*, *V. cholerae*. Осуществлено наполнение интерактивного каталога штаммов микроорганизмов, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора, данными экспериментальных исследований по изучению биологических свойств бактерий и вирусов. Интерактивный каталог, дополненный результатами научных исследований, представлен в составе промежуточного отчета.

Выполнено полногеномное секвенирование штаммов микроорганизмов из фондов Государственных коллекций патогенных микроорганизмов (не менее 150 штаммов). Оформлены паспорта геномных последовательностей штаммов бактерий и вирусов (не менее 150 штаммов).

Проведена разработка технологии мобильной экспресс-идентификации штаммов *Y. pestis*, *B. anthracis*, *F. tularensis*, *V. cholerae*, а также патогенных вирусов в биологических жидкостях и материалах окружающей среды с использованием мономолекулярного секвенирования на основании метагеномного подхода. Проведена разработка методов идентификации изменения экспрессии бактериальных генов, ассоциированных с вирулентностью. Оформлены протоколы РНК-секвенирования бактериальных культур, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора (не менее 8 протоколов).

Проведена разработка технологии определения полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид у штаммов *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*.

Выполнено полногеномное секвенирование не менее 200 штаммов бактерий и вирусов из фондов Государственных коллекций патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора. Оформлено не менее 200 паспортов геномных последовательностей штаммов. На электронном носителе информации представлен каталог нуклеотидных последовательностей CRISPR-Cas системы у штаммов возбудителей особо опасных инфекций, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора.

Разработана технология мобильной экспресс-идентификации штаммов *Burkholderia* spp., *Brucella* spp., веротоксинпродуцирующих штаммов *Escherichia coli* в биологических жидкостях и материалах окружающей среды с использованием мономолекулярного секвенирования на основании метагеномного подхода. Оформлены протоколы идентификации штаммов

в биологических жидкостях и материалах окружающей среды с применением мобильной системы, основанной на использовании мономолекулярного секвенирования, для штаммов *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* и веротоксинпродуцирующих штаммов *E. coli*. Разработан и оформлен проект методических рекомендаций «Экспресс-идентификация возбудителей особо опасных инфекций на основании метагеномного подхода с использованием технологии мономолекулярного секвенирования».

Осуществлена разработка методов идентификации изменения статуса метилирования бактериальной ДНК штаммов патогенных бактерий, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора. Проведен анализ статуса метилирования хромосом и плазмид штаммов патогенных бактерий, депонированных в Государственных коллекциях патогенных микроорганизмов Роспотребнадзора; оформлено не менее 8 протоколов анализа статуса метилирования ДНК методом мономолекулярного секвенирования.

В результате выполнения научно-исследовательских работ по данной Федеральной целевой программе было разработано 28 диагностических, профилактических и лекарственных препаратов, находящихся на разных уровнях утверждения и внедрения. Кроме того, создано, усовершенствовано или освоено множество современных методов исследования патогенов, генно-инженерных технологий конструирования важных для диагностики и профилактики биомолекул, внедрены биоинформационные технологии. Эти обстоятельства позволяют считать, что программа внесла существенный вклад в укрепление биологической безопасности страны и решение подобных задач программно-целевым методом существенно повышает результативность и практическую значимость научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ.

В данном сообщении представлено краткое изложение основных результатов Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)», многие из которых стали заделом для формирования Государственной программы «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации в 2021–2024 годах», в рамках которой будут продолжены научные и прикладные исследования в области санитарно-эпидемиологического благополучия государства.

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

Опасность сибиреязвенных почвенных очагов при проведении земляных работ

И.А.Дятлов, Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, Е.А.Тюрин

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

Попавший в почву возбудитель сибирской язвы образует споры, длительное время сохраняющие жизнеспособность и вирулентность. Анализ имеющихся сведений показывает, что сибиреязвенный микроб может сохранить вирулентность при нахождении в почве до 1300 лет. Все это время сохраняется опасность почвы для людей при проведении земляных работ на территории сибиреязвенных почвенных очагов. К почвенным очагам сибирской язвы относятся сибиреязвенные скотомогильники (захоронения), места падежа, прирезки, стихийные захоронения павших от сибирской язвы животных и другие объекты окружающей среды, содержащие возбудителя сибирской язвы.

Находясь в почве, возбудитель при благоприятных условиях может проходить полный многократный биологический цикл своего развития. В результате может произойти изменение свойств, что мы и наблюдали при выделении возбудителя из проб почвы, отобранных из скотомогильника 70-летней давности.

Ключевые слова: сибирская язва, скотомогильник, риск заражения, ПЦР

Для цитирования: Дятлов И.А., Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Тюрин Е.А. Опасность сибиреязвенных почвенных очагов при проведении земляных работ. Бактериология. 2020; 5(4): 12–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-12-19

The danger of anthrax soil foci during excavation

I.A.Dyatlov, L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, E.A.Tyurin

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

The anthrax pathogen trapped in the soil forms spores that retain their viability and virulence for a long time. Analysis of the available data shows that the anthrax microbe can retain virulence in soil up to 1300 years. All this time, the soil remains dangerous for people during earthworks on the territory of anthrax soil foci. Soil foci of anthrax include anthrax burial grounds (burials), places of death, sites, spontaneous burials of animals killed by anthrax and other environmental objects containing the causative agent of anthrax. Under favorable conditions, the pathogen, being in the soil, can go through a full multiple biological cycle of its development. As a result, we observed a change in properties the pathogen isolated from soil samples taken from a 70 years age cattle burial ground.

Key words: anthrax, burial ground, risk of infection, PCR

For citation: Dyatlov I.A., Marinin L.I., Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Tyurin E.A. The danger of anthrax soil foci during excavation. Bacteriology. 2020; 5(4): 12–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-12-19

По классификации ВОЗ территория Российской Федерации (РФ) относится к зоне спорадического проявления инфекции [1]. Эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в России оценивается как напряженная и не имеющая тенденции к стабилизации [2]. За последние годы заболеваемость остается на не высоком, но стабильном уровне – ежегодно регистрировалось от 2 до 24 случаев сибирской язвы у людей. Однако в 2016 г. заболело 36 человек [3]. При этом в отдельных случаях наступал летальный исход. По последним данным, летальность при кожной форме при отсутствии лечения составляет 10–20%, при лечении – от 1 до 5,8%, а при кишечной и легочной формах

даже при лечении – от 85 до 100%. Это дает основание считать сибирскую язву опасной инфекцией.

Заболевания людей возникали в результате непосредственных контактов с больными сельскохозяйственными животными при проведении вынужденного убоя, при разделке туш и захоронении трупов животных, павших от сибирской язвы, при кулинарной обработке инфицированного мяса, при уходе за больными животными или при торговле мясом на рынке [4]. Как показали наши исследования, возбудитель сибирской язвы сохранял жизнеспособность в мясе до шести месяцев (срок наблюдения) хранения в условиях холодильника, переходя в спорную форму [5].

Для корреспонденции:

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0003

Статья поступила 26.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Leonid I. Marinin, MD, PhD, leading researcher laboratory of anthrax microbiology department of particularly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region
Phone: (4967) 36-0003

The article was received 26.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

Сибирская язва опасна по ряду причин, одной из которых является длительная выживаемость споровой формы возбудителя в почве.

Сибиреязвенная бактерия вне организма при доступе кислорода воздуха образует споры, обладающие большой устойчивостью к высокой температуре, высушиванию и дезинфицирующим веществам. В споровой форме возбудитель способен к длительному переживанию в почве, создавая стационарно-неблагополучные регионы. Контаминированная спорами почва может оставаться источником инфекции длительное время. Описан случай заболевания сибирской язвой человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет тому назад [6]. Сообщается о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном Крюгер-парке (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что они относятся к животным, погибшим от сибирской язвы 200 ± 50 лет назад [7]. Имеется предположение, что возбудитель сибирской язвы может быть активным через 1300 лет нахождения в почве [8]. Так, в Пермской области в пробах грунта, взятого на месте археологических раскопок поселения VII века, был обнаружен возбудитель сибирской язвы, вызвавший заболевание животного [9].

Инфицирование людей споровой формой *Bacillus anthracis* отмечалось при заражении от контаминированной почвы в 3–14% из общего числа заболеваний [10–12]. При этом наблюдали казуистические случаи. Так, кожные проявления сибирской язвы наблюдали вокруг раны на спине, нанесенной ударом кайлы, которой копали землю. На 9-й день в поясничной области обнаружили рану, окруженную пузырьками, отек поясничной области и левой стороны спины до левой лопатки. Температура тела поднялась до 39,7°C. Больной был слаб, лицо бледное, губы и нос цианотичные. В содержимом пустулы выявили наличие бацилл сибирской язвы [13]. Больной скончался на 10-й день от начала заболевания.

Почвенными очагами считаются скотомогильники, биотермические ямы и другие места захоронения трупов животных, павших от сибирской язвы [14]. Наибольшую угрозу для безопасности человека и животных представляют сибиреязвенные скотомогильники. К скотомогильникам относятся места для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных и домашних животных, павших или забитых во время эпизоотии в порядке предупреждения распространения сибирской язвы. Такие скотомогильники называют «сибиреязвенные захоронения (СЯЗ)». Это территория, на которой может происходить инфицирование животных и людей, ведущее к вспышке заболевания сибирской язвой. Причины такой вспышки могут быть различными – от прямого вмешательства человека до геоморфологических процессов [15].

Исходя из этого, производится оценка потенциальной опасности скотомогильника, которая зависит от того, где именно и как был создан скотомогильник. На территории РФ, а также в странах ближнего и дальнего зарубежья находится значительное количество неблагополучных по сибирской язве регионов. В РФ насчитывается около 35 тыс.

стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибиреязвенных скотомогильников [16]. По сведениям Управления ветеринарии с Государственной ветеринарной инспекцией Минсельхозпрода Московской области, на территории Московской области в результате анализа данных за 1901–1988 гг. официально зарегистрировано 265 скотомогильников разных сроков захоронения трупов животных, павших от сибирской язвы, в том числе и в г. Москве. Однако лишь по 42 из них указаны приблизительные координаты, а по остальным нет вообще никаких данных о местах захоронений. При передаче земель от Московской области Москве летом 2012 г. вместе с новыми территориями город получил и скотомогильники, 7 из которых не соответствуют санитарным требованиям – не забетонированы и вокруг них не выделены санитарно-защитные зоны [17].

Наименее опасны оформленные и зарегистрированные скотомогильники. Иначе обстоит дело со старыми или забытыми скотомогильниками, которые попадают в сферу хозяйственной деятельности человека или подвергаются природным ландшафтными изменениям (например, осыпание склонов, подмывание берегов рек, формирование оврагов и впадин). К сожалению, на многих территориях до настоящего времени не налажен должный учет скотомогильников и контроль за их состоянием. Только 52% сибиреязвенных скотомогильников имеют ветеринарно-санитарные карточки. Соответствуют ветеринарно-санитарным требованиям 37,03% сибиреязвенных скотомогильников [2].

В настоящее время в РФ 31,2% сибиреязвенных скотомогильников находятся в собственности юридических лиц, а остальные являются бесхозными [2, 17]. В результате многие захоронения не обозначены ни на картах, ни на местности. Однако кроме бесхозных скотомогильников существуют еще и неучтенные. Более всего их около пустыющих ныне сел и деревень.

Опасность представляет не только сам скотомогильник, но и территория вокруг него. Так, в Республике Мордовия от сибирской язвы пало 55 животных, инфицирование которых произошло вследствие использования зеленого корма, заготовленного на территории в непосредственной близости от скотомогильника.

В Пензенской области заражение животных произошло в результате скармливания им сена, заготовленного на поверхности не задокументированного скотомогильника, созданного в 1960-х гг.

Подтверждением опасности скотомогильников является выделение нами возбудителя сибирской язвы из проб почвы, взятых на месте старого скотомогильника, существующего более 70 лет на берегу Иваньковского водохранилища в Конаковском районе Тверской области [18]. Исторически известно, что в связи со строительством Иваньковского водохранилища в 1936 г. на указанной территории наблюдалась крупная вспышка сибирской язвы. Плотность захоронений животных, павших от сибирской язвы, – 5–6 скотомогильников на каждые 3 км берега водохранилища [19].

Цель работы – анализ риска заражения людей при проведении земляных работ на территории сибиреязвенных почвенных очагов, отбор и исследования проб почвы из старого скотомогильника.

Материалы и методы

Отбор и лабораторные исследования проб почвы для выявления возбудителя сибирской язвы производили в соответствии с Методическими указаниями [20].

С целью обнаружения и выделения возбудителя сибирской язвы использовали микробиологические (высевы на питательные среды), биологические (заражение лабораторных животных) и генетические (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) методы исследований.

Согласно данным литературы, вероятность обнаружения в почве вегетативных клеток возбудителя сибирской язвы невелика [21–23], поэтому для отсеивания неспорных культур проводили термообработку почвенных взвесей при 83°C в течение 13 мин и затем высевали эти пробы на питательные среды: LB-агар с полимиксином, дифференциально-диагностическую среду с фенолфталеинфосфатом натрия или с сорбитом и бромтимоловым синим. Это позволило нам сузить круг поиска *B. anthracis*.

Свойства выделенных культур исследовали по существующим методикам [24, 25].

Для идентификации культур использовали ПЦР с помощью Тест-системы ПЦР «ГенСиб», а также с разработанными в ГНЦ ПМБ праймерами на капсульную плазмиду и на компоненты сибиреязвенного токсина – протективный антиген, летальный и отечный факторы.

В качестве контрольных использовали штаммы *B. anthracis* с различными гено- и фенотипами (81/1; 71/12; СТИ-1) и 7 штаммов близкородственных бацилл группы *B. cereus* из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ.

Результаты и обсуждение

После культивирования на агаровых питательных средах отбирали колонии серовато-матовые, шероховатые, с плоской или слегка выпуклой поверхностью, ворсистой бахромчатой периферией, состоящей из нитей микробных палочек, отходящих от центральной части колонии, что придает ей вид локонов волос, льющей гривы или головы медузы (R-, RRO-формы). С дифференциально-диагностических сред также отбирали характерные колонии. Затем все подозрительные колонии засеивали в бульон Хоттингера и проводили оценку характера роста культур.

В классическом случае через 16–24 ч культивирования в жидких средах отмечается рост на дне пробирок в виде сеточки, нитей или хлопка (комка ваты), бульон остается прозрачным или слегка опалесцирует. В то же время в 2–5% случаев у сибиреязвенных штаммов отмечаются отклонения от типичного роста в бульоне [26, 27] – наблюдается равномерное помутнение бульона, образование пристеночного кольца и аморфного или трудно разбиваемого осадка.

В результате при первичном анализе с питательного агара в чашках Петри отобрали более сотни подозрительных колоний, после оценки характера роста в бульоне осталось около 20 подозрительных культур. Проверили фаголизательность выделенных культур специфическими сибиреязвенными бактериофагами Гамма А-26 и Fah ВНИИВВиМ. Отобрали четыре штамма, которые лизировались специфическими бактериофагами, и несколько штаммов, которые фагами не лизировались.

Проведенные исследования проб почвы из скотомогильника Тверской области позволили выделить шесть изолятов, которые получили обозначения П-1, П-4о, П-4, П-4ш, П-4с и П-14. Характеристики штаммов приведены в табл. 1.

Два штамма (П-1М и П-4о) обладали всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками – типичный рост на агаровой питательной среде и в бульоне, лизательность фагами Гамма А-26 и Fah ВНИИВВиМ, чувствительность к пенициллину (по тесту «жемчужного ожерелья»), образование зоны преципитации на агаре с сибиреязвенным гамма-глобулином. Отсутствие капсулообразования на среде Green, вероятно, связано с их частичной аттенуацией в процессе длительного нахождения в почве. Три штамма, несмотря на типичный рост на агаровой среде, не лизировались фагами и были устойчивы к пенициллину.

Было проведено молекулярно-генетическое типирование выделенных штаммов с помощью ПЦР. Для сравнения исследовали ДНК штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл. Из исследуемых и контрольных штаммов выделили ДНК и проверили в ПЦР с праймерами, разработанными Rамиссе V. et al. [28] для генома сибиреязвенного микроба – протективного антигена (*pag*), летального фактора (*lef*), отечного фактора (*суа*) генов плазмиды rХО1, капсульной субстанции (*cap*) генов плазмиды rХО2 и хромосомного маркера (Ва813). Результаты представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных результатов, только два из шести выделенных штаммов являются «полноценными»

Таблица 1. Свойства штаммов бацилл, выделенных из почвы сибиреязвенного скотомогильника в Тверской области

Штамм	Свойства штаммов					
	Проба с фагами	Зона ингибирования на среде с ампициллином, мм	Гемолиз на кровяном агаре	Проба с сибиреязвенным глобулином	Морфология колоний на среде по Green	Рост в LB-бульоне
П-1М	+	22	–	+	Шероховатые	Типичный
П-4о	+	10	–	+	Шероховатые	Типичный
П-4	+	3	+	±	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4ш	–	0	+	–	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4с	–	0	+	–	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-14	–	0	+	–	Шероховатые	Осадок, бульон прозрачный
СТИ-1	+	32	–	+	Шероховатые	Типичный
71/12	+	30	–	+	Слизистые	Типичный

Таблица 2. Результаты постановки ПЦР с ДНК некоторых штаммов бацилл

Штамм	Результаты с праймерами				
	Ba 813 152 п.н.	Cap 264 п.н.	Lef 385 п.н.	Sya 546 п.н.	Pag 747 п.н.
П-1М	+	+	+	+	+
П-4о	+	+	+	+	+
П-4	+	–	+	–	+
П-4ш	+	–	–	–	–
П-4с	+	–	–	–	–
П-14	+	–	–	–	–
<i>B. anthracis</i> 81/1	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 71/12	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	+	–	+	+	+
<i>B. cereus</i> 504	+	–	–	–	–
<i>B. cereus</i> 217	+	–	–	–	–
<i>B. cereus</i> 164	–	–	–	–	–
<i>B. subtilis</i> 168	–	–	–	–	–
<i>B. thuringiensis</i>	–	–	–	–	–
<i>B. polymixa</i>	–	–	–	–	–
<i>B. megaterium</i>	–	–	–	–	–

B. anthracis в генетическом отношении – это штаммы П-1 и П-4о (в ПЦР выявлены все пять видоспецифических ПЦР-фрагментов *pag*, *lef*, *сya*, *cap*, Ba813), что согласуется с характеристиками выделенных штаммов, приведенными выше. У остальных выделенных культур фрагментов ДНК, соответствующих генам протективного антигена сибиреязвенного микроба, не обнаружено.

Таким образом, из проб почвы были выделены три типа сибиреязвенных культур. Некоторые из них имели свойства, типичные для *B. anthracis*, другие отличались по ряду признаков. Это согласуется с имеющимися сведениями о выделении из объектов внешней среды, наряду с типичными штаммами, атипичных мутантов, значение которых в эпидемиологии и патогенезе сибирской язвы остается не ясным и требует изучения [26, 27].

На основании информации о всех известных за последнее более чем 100 лет стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах в России создан «Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации» [23, 29]. В нем отражены сведения о локализации стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов – республика, область, район, сельская администрация, населенный пункт. Кадастр содержит также сведения о годах, в которые регистрировались случаи заболеваний сибирской язвой людей и животных.

Всего в РФ за период 1900–2003 гг. зарегистрирован 36091 адрес стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, в которых учтено более 72 000 вспышек и отдельных случаев заболеваний сибирской язвой людей и животных [30]. Включенные в Кадастр сведения отражают целостную характеристику почвенных очагов сибирской язвы, позволяют проводить ретроспективный анализ и дают возможность прогнозировать активизацию очагов. Однако встречаются и неучтенные скотомогильники. В результате

реорганизации сельхозпредприятий (ликвидации совхозов и колхозов), сокращения общественного животноводства часть скотомогильников оказались бесхозными и зачастую эксплуатируются стихийно. Так, на основании паспортизации скотомогильников в Республике Бурятия выявлено 231 сибиреязвенное захоронение, из них всего лишь для 9 установлено точное местонахождение [30]. В 2000 г. в Тамбовской области источником заражения животных послужил разрытый при проведении земляных работ неучтенный скотомогильник, хотя ранее местность считалась благополучной по сибирской язве.

Несмотря на создание Кадастра, наблюдения свидетельствуют о необходимости более детального ретроспективного изучения эпизоотологической обстановки на каждой административной территории. По данным Апалькина В.А. с соавт. [12], в 2000–2004 гг. 18 очагов из 70 были выявлены на участках, ранее считавшихся благополучными. Поэтому до настоящего времени остаются актуальными проблема уточнения Кадастра неблагополучных пунктов и учет возникших в прошлом мест захоронений павших от сибирской язвы животных. Традиционно сложившаяся привязка неблагополучия к населенным пунктам часто препятствует объективной оценке потенциала опасности. В минувшем столетии исчезли с лица земли десятки тысяч деревень, несколько раз изменялось административно-территориальное деление практически каждой области (края, республики). В результате многие неблагополучные пункты остались без «точного адреса».

Встреча со старым неучтенным скотомогильником может произойти при проведении различного характера земляных работ. Поэтому необходимо знание эпидемиологического состояния местности, где предполагаются такие работы. Наряду с изучением документов проводятся изыскания на местности. При этом важным является опрос граждан, являющихся очевидцами захоронений или знающих их местонахождение.

При выявлении конкретного места захоронения ориентируются на особенности рельефа местности. Как правило, земля под старым скотомогильником образует небольшую впадину, которая выделяется на общем фоне, имеет правильную геометрическую форму, а края впадины возвышаются над уровнем окружающего грунта. Кроме того, в лесистой местности можно заметить, что в самой впадине и вокруг нее деревья несколько моложе, чем в общем массиве.

Установив место предполагаемого захоронения, проводят историческую оценку его месторасположения. При этом сопоставляют дату вспышки сибирской язвы с возрастом деревьев, расположенных в округе, бывшее расположение и конфигурацию населенных пунктов, животноводческих объектов, дорог и скотогонных трасс. Тем самым подтверждается или опровергается вероятность захоронения сибиреязвенных трупов в исследуемом месте.

Все сибиреязвенные скотомогильники должны удовлетворять определенным санитарным требованиям в соответствии с п.п. 5.6–5.10 «Ветеринарно-санитарных правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» [31]. Ранее практически у каждой деревни имелись обычные ямы-захоронения животных, погибших от любых причин, в том числе сибирской язвы. Поэтому до настоящего времени



Рис. 1. Заброшенный скотомогильник в Пермском крае.



Рис. 2. Обозначение сибирязвненного скотомогильника в Тверской области.



Рис. 3. Обозначение сибирязвненного скотомогильника в Кировской области (А).

оборудование многих скотомогильников не соответствует ветеринарным и санитарным требованиям. Тысячи скотомогильников брошены (рис. 1), не огорожены, а зачастую даже не отмечены на специальных картах.

Проверка, проведенная в Уральском Федеральном округе, показала, что из 1659 известных захоронений больных животных только 189 отвечают требованиям «Ветеринарно-санитарных правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» [31].

Вот как обозначен скотомогильник в 2003 г. в Тверской области (рис. 2). На стволе березы прибитая табличка с надписью «сибирязвненный скотомогильник», на которую нанесены слова «брехня», «туалет». Других обозначений, ограждений нет. Вокруг заросли кустарника [32].

На рис. 3 приведено состояние скотомогильника в Кировской области в июне 2011 г. (А). В нарушение требований законодательства место захоронения биологических отходов со спорами сибирской язвы огорожено деревянным забором высотой 150–170 см из жердей с промежутками между ними в 20–25 см, водозаборная траншея внутри ограждения не имеет достаточных глубины и ширины, высота кургана над скотомогильником ниже необходимого уровня. На этом же рисунке приведен пример оборудования скотомогильника (Б) в соответствии с Санитарными требованиями.

Заключение

Учитывая наличие большого количества почвенных очагов, их неполный учет, можно сказать, что существует риск заражения людей сибирской язвой при проведении на территории сибирязвненных почвенных очагов земляных работ: добыча грунта и его перемещение, рытье траншей, окопов, блиндажей и др. Особенно опасна встреча с неучтенными старыми скотомогильниками, сведения о точном месте расположения которых отсутствуют или утрачены. Поэтому необходимо знание эпидемиологического состояния местности, где предполагаются земляные работы.

Одной из причин опасности почвенных очагов сибирской язвы является длительное сохранение возбудителем жизнеспособности и вирулентности. Подтверждением длительной



Рис. 3. Оборудование скотомогильника в соответствии с Санитарными требованиями (Б) в Свердловской области.

сохранности жизнеспособности возбудителем сибирской язвы является выделение нами сибиреязвенного микроба из проб почвы, взятых на месте старого скотомогильника, существовавшего более 70 лет на берегу Иваньковского водохранилища в Конаковском районе Тверской области [18]. Проведенные исследования проб почвы позволили выделить шесть изолятов, из которых два обладали всеми типичными для возбудителя сибирской язвы идентификационными признаками, в том числе при молекулярно-генетическом типировании выделенных штаммов с помощью ПЦР. Отсутствие капсулообразования, вероятно, связано с частичной аттенуацией микробных клеток в процессе длительного нахождения в почве. Выделение аналогичных штаммов из почвы скотомогильников с различной давностью (20–50 лет) захоронения сибиреязвенных трупов описано в литературе [33–36].

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Hugh-Jones ME. World Situation 1993/94. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Sept. 19-21, 1995. - Salisbury Med. Bull. - Special Supplement. 1996;87:1-2.
- Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А.Ю.Поповой №81 от 10.12.2014 «Об усилении мероприятий, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации».
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Ежлова ЕБ, и др. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под ред. А.Ю.Поповой, А.Н.Куличенко. Ижевск: ООО «Принт-2»; 2017, 313 с.
- Симонова ЕГ, Локтионова МН, Хадарцев ОС, Картавая СА. Характеристика современной эпидемиологической ситуации по сибирской язве в Российской Федерации. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под ред. А.Н.Куличенко. Ставрополь: ООО «Эксо-Медиа»; 2012, с. 71.
- Маринин ЛИ, Тюрин ЕА, Мокриевич АН, и др. Опасность мясных продуктов, инфицированных возбудителем сибирской язвы. Актуальные проблемы безопасности и анализа риска здоровью населения при воздействии факторов среды обитания. Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под ред. проф. А.Ю.Поповой, акад. РАН Н.В.Зайцевой. Пермь, 2015, с. 196-200.
- Адамович ВЛ, Белицкая ГА, Кукарекин НФ. К вопросу оздоровления почвенных очагов сибирской язвы в Брянской области. В сб.: Вопросы эффективности противосибиреязвенных мероприятий. Материалы Всесоюзного научного симпозиума IX Пленарного заседания межведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, с. 170-171.
- Van de Vos. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11-13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
- Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982;33:60.
- Тамиранов А. В двух шагах от сибирской язвы. Fa tamiranov.livejournal.com.352611.html.
- Артеменков МП. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве и меры борьбы с ней в Семипалатинской области Казахстана. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР. Сб. тез. докл. X Пленарного засед. Межведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1978, с. 31-32.
- Атакишиева АЧ, Байрамова ЭБ, Шаджанов АН, и др. Современное состояние эпидемиологии, клиники и диагностики сибирской язвы в Туркмении. Здравоохранение Туркмении. 1991;6:18-21.
- Апалькин ВА, Ведерников ВА, Селиверстов ВВ, Листишенко АА. Сибирская язва в России. Эпизоотологический статус и дальнейшее совершенствование системы профилактики. Ветеринария. 2005;6:3-6.
- Стройновский ФС. Случай сибирской язвы (Pustula maligna). Вестник общественной гигиены, судебной и практической медицины. 1906;4:504-508.
- Профилактика сибирской язвы. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.17.2629-10.
- Николаенко ДВ. Скотомогильник как объект и предмет естественнонаучного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:211-329.
- Состояние ветеринарных служб субъектов Российской Федерации в 2011 г.: Отчет Информационно-аналитического центра Россельхознадзора. Владимир, 2012, с. 75-77.
- Картавая ОА. Оценка эпизоотолого-эпидемиологической опасности сибиреязвенных захоронений на территории Российской Федерации. Дисс. ...канд. мед. наук. ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. М., 2014, 139 с.
- Шишкова НА, Маринин ЛИ, Мокриевич АН, и др. Микробный профиль сибиреязвенного скотомогильника до и после санации. В сб.: Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека. Труды Юбилейной Всероссийской научной конфер., посвящ. 75-летию кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова и 90-летию со дня рождения академика В.Д.Белякова. Санкт-Петербург, 19-20 апреля 2012 г. Санкт-Петербург, 2012, с. 167-168.
- Кноп АГ. Влияние антропогенного преобразования природы на почвенные очаги сибирской язвы. В сб.: Современные проблемы зоонозных инфекций. Тез. Докл. Всесоюзной межведомственной конфер. Симферополь, 1981. М., 1981, с. 25-27.
- Методические указания Главного государственного санитарного врача РФ – МУК № 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009, 126 с.
- Коронный АВ. Развитие бацилл антракса в почве и процессы изменчивости их. Сб. науч. трудов Эстонской сельскохозяйственной академии. Т. 4. Тарту, 1958, с. 99-105.
- Симонова ЕГ, Картавая СА, Локтионова МН, Ладный ВИ. Эпидемиологическая опасность сибиреязвенных захоронений: теоретико-методологические аспекты. Медицина в Кузбассе. 2013;XII(2):26-31.
- Черкасский БЛ. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: Интерсэ; 2002, 384 с.
- Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. Под ред. Л.И.Маринина, И.А.Дятлова. М.: «Гигиена»; 2009, 304 с.
- Шишкова НА, Платонов МЕ, Мокриевич АН, и др. Изучение генетического разнообразия штаммов сибиреязвенного микроба из коллекции ГНЦ ПМБ. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;2(104):60-65.

26. Обносова НВ, Шуляк ВП. О патогенных свойствах возбудителя сибирской язвы в разных очагах. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР: Тез.докл. X Пленарного засед. междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой (Баку, 28–29 сентября 1978г.). М., 1978, с. 123–124.
27. Соркин ЮИ, Родзиковский АВ. Экология сибиреязвенного микроба в естественных биоценозах почв различных природных зон СССР. Экология возбудителей сапронозов. Сб. науч. трудов. М., 1988, с. 65–79.
28. Ramiise V, Patra G, Garrigue H, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996;145(1):9–16.
29. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. Справочник. М.: Интерсен; 2005, 830 с.
30. Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Сибиреязвенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010;4:23–26.
31. Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» № 13-7-2/469, 1995.
32. Лифанцев Д, Тишкина М. Смертельные язвы Московского моря. Экспресс-газета. 2003;21(434):4.
33. Баркова ИА, Барков АМ, Алексеев ВВ, Липницкий АВ. Способ идентификации *Bacillus anthracis* с дифференциацией штаммов по продукции капсулы, протективного антигена и антигенов S-слоя. Патент RU2376385, 2008.
34. Лебединская ИС, Симакова ИН, Харикова АА. Об активности почвенных очагов сибирской язвы в Воронежской области. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР: Тез. докл. X Пленарного засед. междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой (Баку, 28–29 сентября 1978г.). М., 1978, с. 142–143.
35. Неляпин НМ, Буравцева НП, Скляров ВЯ, Кулешова ЛИ. Характеристика штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных на Кавказе. Проблемы особо опасных инфекций. 1973;6(34):137–139.
36. Шляхов ЭН, Груз ЕВ, Присакарь ВИ. Сибирская язва (очерки эпидемиологии, лабораторной диагностики и профилактики). Кишинев, 1975, 162 с.
7. Van de Vos. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19–23.
8. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982;33:60.
9. Tamiranov A. V dvukh shagakh ot sibirskoi yazvy. Fa tamiranov.livejournal.com.352611.html. (In Russian).
10. Artemenkov MP. Epizootological and epidemiological situation of anthrax and measures to combat it in the Semipalatinsk region of Kazakhstan. In: prospects of the fight against anthrax in the USSR. Proceedings of X of the Plenary session. Moscow, 1978, pp. 31–32. (In Russian).
11. Atakishieva ACh, Bairamova EB, Shadzhanov AN, et al. Sovremennoe sostoyanie epidemiologii, kliniki i diagnostiki sibirskoi yazvy v Turkmenii. Zdravookhranenie Turkmenii. 1991;6:18–21. (In Russian).
12. Apalkin VA, Vedernikov VA, Seliverstov VV, Listishenko AA. Sibirskaya yazva v Rossii. Epizootologicheskii status i dal'neishee sovershenstvovanie sistemy profilaktiki. Veterinariya. 2005;6:3–6. (In Russian).
13. Stroinovskii FS. Sluchai sibirskoi yazvy (Pustula maligna). Vestnik obshchestvennoy gigieny, sudebnoy i prakticheskoy meditsiny. 1906;4:504–508. (In Russian).
14. Prevention of anthrax. Sanitary and epidemiological rules. SP 3.17.2629–10. (In Russian).
15. Nikolaenko DV. Skotomogil'nik kak ob'ekt i predmet estestvennonauchnogo issledovaniya. Sluchai Ukrainy. Environmental Epidemiology. 2011;2:211–329. (In Russian).
16. State of veterinary services of the subjects of the Russian Federation in 2011. Report of the Rosselkhoz nadzor Information and Analytical Center. Vladimir, 2012, pp. 75–77. (In Russian).
17. Kartavaya OA. Otsenka epizootologo-epidemiologicheskoi opasnosti sibireyazvennykh zakhoroneni na territorii Rossiiskoi Federatsii. Diss. Moscow, 2014, 139 p. (In Russian).
18. Shishkova NA, Marinin LI, Mokrievich AN, et al. Microbial profile of the anthrax cattle burial ground before and after sanitation. In: Epidemiology in the XXI century Proceedings of the Jubilee All-Russian Scientific Conference. St. Petersburg, 2012, pp. 167–168. (In Russian).
19. Knop AG. Influence of anthropogenic transformation of nature on soil foci of anthrax. In: Modern problems of zoonotic infections. Proceedings of All-Union Interdepartmental Conference. Simferopol, 1981. Moscow, 1981, pp. 25–27. (In Russian).
20. Methodical instructions of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation – MUK No 4.2.2413-08 "Laboratory diagnostics and detection of the causative agent of anthrax"; 2009, 126 p. (In Russian).
21. Koronnyi AV. Razvitie batsill antraksa v pochve i protsessy izmenchivosti ikh. Sb. nauch. trudov Estonskoi sel'skokhozyaistvennoy akademii. Vol. 4. Tartu, 1958, pp. 99–105. (In Russian).
22. Simonova EG, Kartavaya SA, Loktionova MN, Ladny VI. Epidemiological hazard of anthrax animal burials: theoretical and methodological aspects. Medicine in Kuzbass. 2013;XII(2):26–31. (In Russian).
23. Cherkasskii BL. Epidemiologiya i profilaktika sibirskoi yazvy. Moscow: «Interse» Publ.; 2002, 384 p. (In Russian).
24. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, et al. Metody izucheniya biologicheskikh svoistv vozbuditelya sibirskoi yazvy. Edited by L.I.Marinin, I.A.Dyatlov. Moscow: «Gigiena» Publ.; 2009, 304 p. (In Russian).
25. Shishkova NA, Mokrievich AN, Platonov ME, Svetoch TE, Marinin LI. Study of the Genetic Diversity of the Anthrax Microbe Strains from the Collection of SRC AMB. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2010;2(104):60–65. (In Russian).
26. Обносова НВ, Шуляк ВП. О патогенных свойствах возбудителя сибирской язвы в разных очагах. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР: Тез.докл. X Пленарного засед. междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой (Баку, 28–29 сентября 1978г.). М., 1978, с. 123–124. (In Russian).

References

1. Hugh-Jones ME. World Situation 1993/94. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Sept. 19–21, 1995. - Salisbury Med. Bull. - Special Supplement. 1996;87:1–2.
2. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation A.Yu.Popova No.81 of 10.12.2014 "On strengthening measures aimed at the prevention of anthrax in the Russian Federation". (In Russian).
3. Popova AYu, Demina YuV, Ezhlova EB, et al. Opyt likvidatsii vspyshki sibirskoi yazvy na Yamale v 2016 godu. Edited by A.Yu.Popova, A.N.Kulichenko. Izhevsk: «Print-2» Publ.; 2017, 313 p. (In Russian).
4. Simonova EG, Loktionova MN, Khadartsev OS, Kartavaya SA. Characteristics of the current epidemiological situation of anthrax in the Russian Federation. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation. Edited by A.N.Kulichenko. Stavropol: «Ekso-Media» Publ.; 2012, p. 71. (In Russian).
5. Marinin LI, Tyurin EA, Mokrievich AN, et al. The danger of meat products infected with anthrax. Current problems of safety and analysis of the risk to public health under the influence of environmental factors. Materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with International participation. Edited by A.Yu.Popova, N.V.Zaitseva. Perm, 2015, p. 196–200. (In Russian).
6. Adamovich VL, Belitskaya GA, Kukarekin NF. On the issue of improving the soil foci of anthrax in the Bryansk region. In: Issues of the effectiveness of anti-ulcer measures. Proceedings of the All-Union Scientific Symposium. Moscow, 1974, p. 170–171. (In Russian).

27. Sorokin Yul, Rodzikovsky AV. Ecology of the anthrax microbe in natural biocenoses of soils of various natural zones of the USSR. Ecology of sapronosis pathogens. Moscow, 1988, pp. 65-79. (In Russian).
28. Ramisse V, Patra G, Garrigue H, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996;145(1):9-16.
29. Cadastre of permanently unfavorable anthrax points of the Russian Federation. Moscow: "Intersen" Publ.; 2005, 830 p. (In Russian).
30. Simonova EG, Galkin VV, Loktionova MN, Ladnyi VI. Anthrax cattle burial grounds in Russia and their biosafety. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2010;4:23-26. (In Russian).
31. Veterinary and sanitary rules for disposal and destruction of biological waste» № 13-7-2/469, 1995. (In Russian).
32. Lifantsev D, Tishkina M. Smertel'nye yazvy Moskovskogo morya. Ekspres-gazeta. 2003;21(434):4. (In Russian).
33. Barkova IA, Barkov AM, Alekseev VV, Lipnitskii AV. Method of identification of *Bacillus anthracis* with differentiation of strains by capsule production, protective antigen and S-layer antigens. Patent RU2376385, 2008. (In Russian).
34. Lebedinskaya IS, Simakova IN, Kharikova AA. On the activity of soil foci of anthrax in the Voronezh region. In: Prospects combat anthrax in the Soviet Union. Proceedings of X of the Plenary session. Moscow, 1978, pp. 142-143. (In Russian).
35. Nelyapin NM, Buravtseva NP, Sklyarov VYa, Kuleshova LI. Kharakteristika shtammov vzbuditelya sibirskoi yazvy, vydelennykh na Kavkaze. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 1973;6(34):137-139. (In Russian).
36. Shlyakhov EN, Gruz EV, Prisakar VI. Sibirskaya yazva (oчерki epidemiologii, laboratornoi diagnostiki i profilaktiki). Kishinev, 1975, 162 p. (In Russian).

Информация об авторах:

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

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
 Телефон: (4967) 36-0003

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: mokrievich@obolensk.org

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
 Телефон: (4967) 36-0016
 E-mail: turin@obolensk.org

Information about authors:

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
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: dyatlov@obolensk.org

Nina A. Shishkova, PhD (Biology), leading researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region
 Phone: (4967) 36-0003

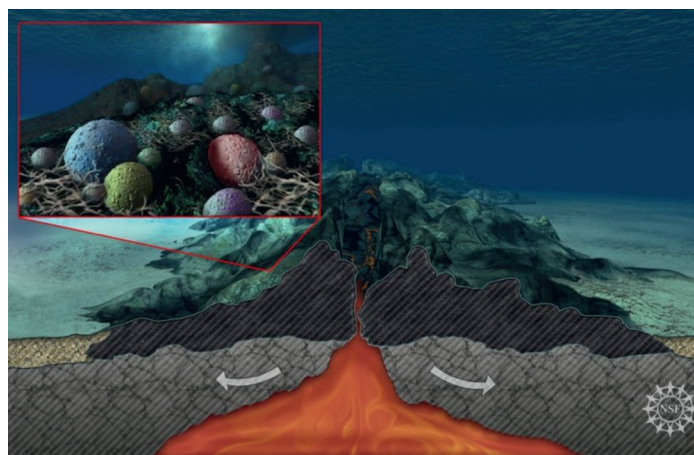
Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, head of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: mokrievich@obolensk.org

Eugene A. Tyurin, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region
 Phone: (4967) 36-0016
 E-mail: turin@obolensk.org

Биологи обнаружили бактерии, которые живут ниже дна океана

При бурении в Нанкайской впадине в зоне Филиппинской литосферной плиты биологи из Бременского университета обнаружили микроорганизмы, обитающие на 1180 м ниже уровня морского дна. Это сейсмоактивная зона, и по мере погружения микробов становится меньше, а при температуре выше 45°C они почти исчезают. Однако в более глубоких пластах при температуре 100°C были обнаружены бактериальные эндоспores. Считается, что эти микроорганизмы будут долго выживать наступления более оптимальных условий.

Шахова С. Бактерии-экстремалы: найдены микроорганизмы, живущие ниже дна океана [Electronic resource]. Правда.Ру. 2020. URL: <https://www.pravda.ru/news/science/1563571-bakterii/> (accessed 08.12.2020).



Получение и определение концентрации в культуральной жидкости фаэцина – пептидного бактериоцина *Enterococcus faecium*

В.М.Борзенков, В.П.Левчук, В.И.Суровцев

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

Фаэцин – пептидный бактериоцин с молекулярной массой ~5 кДа – получен и очищен до электрофоретически чистого состояния с выходом ~70% от общей активности в культуральной жидкости (КЖ). Метод времяпролетной масс-спектрометрии показал, что бактериоцин состоит из двух компонентов А и В с близкими молекулярными массами. В ранее опубликованных работах выход очищенных бактериоцинов, как правило, не превышал 4–5% от общей активности в КЖ. Авторы полагают, что увеличение выхода связано с тем, что учитывалось не только сходство пептидных бактериоцинов с высокомолекулярными белками, но и отличия, связанные с малой молекулярной массой, способностью к гидрофобному взаимодействию при нейтральных и слабощелочных значениях pH и устойчивостью к денатурации. Использование метода Скоупса позволило определить концентрацию фаэцина на конечной стадии очистки и в КЖ в абсолютных единицах (мг/л). Описанные в работе методы очистки с высоким выходом, вероятно, применимы и для других бактериоцинов вследствие близости их физико-химических свойств.

Ключевые слова: *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, бактериоцин, фаэцин, культуральная жидкость, адсорбционная хроматография, уравнение Скоупса

Для цитирования: Борзенков В.М., Левчук В.П., Суровцев В.И. Получение и определение концентрации в культуральной жидкости фаэцина – пептидного бактериоцина *Enterococcus faecium*. Бактериология. 2020; 5(4): 20–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-20-24

Obtaining and determination of the concentration in the culture fluid of phaecin – peptide bacteriocin *Enterococcus faecium*

V.M.Borzenkov, V.P.Levchuk, V.I.Surovtsev

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

Phaecin, a peptide bacteriocin with a molecular mass of ~5 kDa, was obtained and purified to an electrophoretically pure state with a yield of ~70% of the total activity in the culture fluid. The method of time-of-flight mass spectrometry (MALDI) showed that bacteriocin consists of two components A and B with similar molecular mass. In previously published works, the yield of purified bacteriocins, usually did not exceed 4–5% of the total activity in the culture fluid. The authors believe that the increase in yield is due to the fact that not only the similarity of bacteriocins with high molecular mass proteins was taken into account, but also differences associated with low molecular mass, the ability to hydrophobic interaction at slightly alkaline pH values and resistance to denaturation. Using the Scopes method, it was possible to determine the concentration of phaecin in the final stage of purification and in the culture fluid in absolute units (mg/l). The methods of the purification with high yield described in this work are probably applicable to other bacteriocins due to the proximity of their physicochemical properties.

Key words: *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, bacteriocin, phaecin, culture liquid, adsorption chromatography, Scopes equation

For citation: Borzenkov V.M., Levchuk V.P., Surovtsev V.I. Obtaining and determination of the concentration in the culture fluid of phaecin – peptide bacteriocin *Enterococcus faecium*. Bacteriology. 2020; 5(4): 20–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-20-24

Для корреспонденции:

Борзенков Валерий Михайлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник сектора разработки диагностических препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: vmborzenkov@mail.ru

Статья поступила 08.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Valery M. Borzenkov, PhD (Biology), senior researcher of the sector for the development of diagnostic preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: vmborzenkov@mail.ru

The article was received 08.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

Хотя появление антибиотиков привело к эффективному лечению многих инфекционных заболеваний, их умеренно широкое применение имело отрицательный результат. Многие штаммы патогенных бактерий стали устойчивыми к пенициллину, затем появились полирезистентные, а в последнее время – «супербактерии», устойчивые почти ко всем традиционным антибиотикам. Кроме того, некоторые из антибиотиков, несмотря на небольшую молекулярную массу, становятся сильными аллергенами при взаимодействии с белками плазмы. Поэтому поиск новых антимикробных средств, особенно тех, которые эффективно действуют на полирезистентные бактериальные патогены, является весьма актуальной задачей.

Одним из перспективных кандидатов в борьбе с болезнетворными бактериями являются бактериоцины – белки и амфифильные пептиды, синтезируемые и секретируемые многими бактериями [1]. По сравнению с традиционными антибиотиками пептидные бактериоцины малотоксичны, не аллергенны и не реактогенны и действуют намного эффективнее традиционных антибиотиков [2]. Можно полагать, что они должны найти широкое применение как консерванты и для медицинских целей.

Для медицины требуются высокоочищенные бактериоцины, но их выход по общей активности обычно не превышает 4–5% от активности в культуральной жидкости (КЖ), и это является одной из основных причин того, что они пока не используются. Низкий выход, вероятно, объясняется тем, что для очистки применяют методы, дающие высокий выход для высокомолекулярных белков, но не для низкомолекулярных пептидных бактериоцинов (молекулярные массы ~3–9 кДа). Так, на первой стадии обычно используется осаждение сульфатом аммония [3], что приводит к потере 50% и более общей активности. На последующих стадиях потери растут, и очищенный продукт получают с выходом не более 4–5% от активности в КЖ (от долей до нескольких мг на 1 л). Недавно был получен высокоочищенный рекомбинантный бактериоцин – авицин, природным продуцентом которого является *Enterococcus avium*, близкородственная культура *Enterococcus faecium*. Рекомбинантный авицин был получен путем экспрессии в *Escherichia coli* под контролем промотора бактериофага T7. Выход очищенного продукта составлял 5 мг на 1 л [4].

Цель данной работы: получение электрофоретически чистого фаэцина – пептидного бактериоцина, секретируемого клетками *E. faecium* – с выходом ~70% от общей активности в КЖ и определение концентрации бактериоцина в КЖ в абсолютных единицах (мг/л).

Материалы и методы

Бактериальные культуры. В работе использовали культуру клеток продуцента бактериоцина *E. faecium* 1073 и тест-культуру *Listeria monocytogenes* 776 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболонск».

Выращивание штамма-продуцента. Штамм *E. faecium* 1073 выращивали в колбах объемом 0,75 л на питательном MRS-бульоне, приготовленном специально для лактобактерий. Состав (г/л): протеозопептон – 10; мясной экстракт – 10; дрожжевой экстракт – 5; глюкоза – 20; твин-80 – 1; цитрат

аммония – 2; CH₃COONa – 5; MgSO₄ – 0,1; Na₂HPO₄ – 2; MnSO₄ – 0,05. Конечное значение pH при 25°C 7,2 ± 0,2. Культивировали в качалочных колбах объемом 0,75 л, содержащих 0,28 л питательной среды, на термостатируемой качалке Biosan ES-20/60 (BIOSAN, Латвия) при 37°C, 130 об./мин в течение 24 ч. После окончания ферментации (общий объем 1100 мл) определяли оптическую плотность при 590 нм и значение pH.

Выращивание штамма тест-культуры. Тест-культурой для проверки активности бактериоцинов был штамм *L. monocytogenes* 776 из коллекции культур ГНЦ ПМБ. Культивирование и питательная среда такие же, как у штамма *E. faecium* 1073. Все реактивы производства «Химмед» (Россия), квалификация ч.д.а. Во всех случаях раствор глюкозы с солью магния и дрожжевым экстрактом стерилизовали отдельно при 0,5 атм, 30 мин.

Очистка бактериоцина. Для очистки использовали методы концентрирования на установке УПЛ-0,6 (г. Кириши, Россия) с полыми волокнами, отсекающими макромолекулы с молекулярной массой более 15 кДа (объем концентрата 193 мл), центрифугирования (5000 g, 20 мин), выдерживания раствора с бактериоцином при pH 2,7, обработки изопропанолом, выпаривания спирта на роторном испарителе до 35 мл, адсорбционной хроматографии на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозах в 0,02 М трис-HCl буфере, pH 8,2 (колонки 1,6 × 50) с микрогранулированными сорбентами GE Healthcare (Швеция). Детекцию осуществляли с помощью хроматографа АКТА prime GE Healthcare (Швеция) при A280.

Определение антимикробной активности. Активность фракций бактериоцина определяли по лизису клеток с использованием тест-культуры *L. monocytogenes*. Супернатант, полученный после удаления клеток или клеточных фрагментов, анализировали в двукратных разведениях. Для этого 10 мкл из каждого разведения наносили на чашки Петри со свежеприготовленным газоном тест-культуры. За единицу удельной активности принимали максимальное разведение бактериоцина, вызывающее видимое подавление роста клеток тест-культуры.

Электрофорез. Для определения молекулярной массы и чистоты бактериоцина использовали SDS PAG-электрофорез в 16%-м полиакриламидном геле со следующим набором маркеров: соевый ингибитор трипсина (21,5 кДа), рибонуклеаза (13,7 кДа) и инсулин человека (5,7 кДа).

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрические данные очищенного бактериоцина получали на масс-спектрометре Microflex, LRF MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия). В качестве калибровочного стандарта использовали Peptide Calibration Standart II (Bruker Daltonics, Германия). Образцы вносили в ячейку MSP-чипа MSP 96 (Bruker Daltonics, Германия) и покрывали насыщенным раствором α-циано-4-гидроксикоричной кислоты в смеси 50% ацетонитрила, 2,5% трифторуксусной кислоты и 47,5% воды (об/об). Обработку спектров проводили с помощью программы Flex Control (Bruker Daltonics, Германия) в линейном режиме, частота азотного лазера 60 Гц, в диапазоне масс 4–13 кДа. Обработку и анализ спектров проводили, используя программу Flex Analysis (Bruker Daltonics, Германия).

Определение концентрации бактериоцина в культуральной жидкости. Для определения концентрации бакте-

риоцина в КЖ использовали формулу $A_{205}^{1 \text{ мкг/мл}} \approx 31$, применимую для белков и длинноцепочечных пептидов. Значение pH доводили 6н HCl до 4,0, для удаления балластных белков проводили ультрафильтрацию. При таком значении pH бактериоцины не образуют агрегатов. Для предотвращения адсорбции на стенках кюветы применяли сульфат натрия. Далее определяли A_{205} каждого разбавления (в 100, 200, 300, 400 раз). Полученная прямая указывает на отсутствие олигомеров в этих растворах. Учитывая разбавление, процент активности в очищенном образце по отношению к активности в КЖ и начальный объем, находили концентрацию бактериоцина (суммарную концентрацию фаэцинов А и В) в КЖ.

Результаты и обсуждение

В данной работе очистка фаэцина основана на его физико-химических свойствах: способности агрегировать в слабощелочных и нейтральных условиях, как и другие длинноцепочечные катионные пептиды с $pI > 5$, сохранять полную активность при кислых и слабощелочных значениях pH и при повышенной температуре [6]. Первым этапом очистки фаэцина было концентрирование КЖ на полых волокнах. Это не только уменьшает объем начальной суспензии, но и повышает концентрацию фаэцина, что важно для последующего отделения фрагментов клеточных стенок. Для концентрирования фаэцина использовали полые волокна, которые отсекают макромолекулы с молекулярной массой 15 кДа. 90–95% фаэцина было обнаружено в концентрате. Это указывает на то, что в слабощелочных условиях фаэцин находится в виде агрегатов, образующихся из молекул пептида, связывающихся благодаря гидрофобным взаимодействиям [5]. После отделения клеток центрифугированием в супернатанте остаются фрагменты клеточных стенок, всегда присутствующие вместе с клетками. Их отделяют, доводя значение pH до 2,7. Кислые белки с изоточкой ~3, находящиеся на поверхности фрагментов, теряют заряд, фрагменты агрегируют, коагулируют и легко отделяются центрифугированием (12 000 г, 15 мин). Удаляется также и часть балластных белков, находящихся в свободном состоянии и денатурирующих при кислых значениях pH. Затем pH раствора поднимают до слабощелочного и выдерживают его при температуре 85°C в течение 30 мин. Большинство остающихся балластных белков денатурирует и удаляется центрифугированием. Потери активности на этих этапах составляют не более 10–15% от общей активности в КЖ.

На последней стадии очистки бактериоцина использовали метод адсорбционной хроматографии на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозах, разработанный нами для очистки пероксидазы [7]. Принцип метода состоит в том, что раствор целевого белка наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0,02 М буфером со значением pH, близким к изоточке этого белка. Поскольку его заряд очень мал, то он будет медленно двигаться по колонке, так как слабые адсорбционные силы не могут его удержать. Балластные же белки, заряд которых гораздо больше, чем у целевого белка, будут быстро продвигаться под действием электростатических сил, и таким образом происходит очистка целевого продукта. При переносе элюата на колонку с КМ-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером, целевой

продукт очищается от балластных белков противоположного заряда. Таким образом, очистка происходит на двух колонках, при этом не требуется дополнительных стадий и целевой продукт получают с высоким выходом. Метод принципиально отличается от ионообменной хроматографии (ИОХ). Метод ИОХ основан на постепенном увеличении ионной силы при заданном значении pH, и белки, имеющие большой заряд, выходят из колонки после белков с меньшим зарядом. При использовании метода, в зависимости от градиента, возможно применение довольно коротких колонок.

В методе адсорбционной хроматографии белки, имеющие значение изоточки, близкой к pH используемого буфера, слабо удерживаются за счет адсорбционных сил и медленно движутся вниз по колонке. Белки, изоточки которых находятся сравнительно далеко от значения pH раствора, либо быстро движутся по колонке, отталкиваясь от одноименно заряженного ионообменника, либо, имея противоположный заряд, остаются на ней [7]. В случае очистки адсорбционной хроматографией предпочтительными будут колонки сравнительно большой длины, поскольку хроматография происходит при постоянной и небольшой ионной силе. Этот метод в ряде случаев имеет преимущество перед ИОХ, так как очистка идет сразу на двух колонках (катионо- и анионообменнике). Дополнительные методы очистки не требуются, поскольку целевой продукт дает одну полосу на электрофореграмме (рис. 1).

Хотя фаэцин дает одну полосу в электрофорезе, масс-спектрометрические данные показали, что он состоит из двух компонентов А и В с близкими молекулярными массами (рис. 2).

Одна полоса в электрофорезе объясняется тем, что фаэцины А и В имеют близкие молекулярные массы и, вероятно, один из них является минорным компонентом. Таким образом, фаэцин был очищен с выходом ~70% от общей активности в КЖ. Данные по очистке фаэцина приведены в таблице.

Результаты данной работы показывают, что метод адсорбционной хроматографии применим не только для белков, но и для длинноцепочечных пептидов, образующих агрегаты при нейтральных и слабощелочных условиях.

Обычно выход на какой-либо стадии определяется как процент от общей активности в КЖ, а активность выражают в условных единицах. Но часто необходимо знать концен-

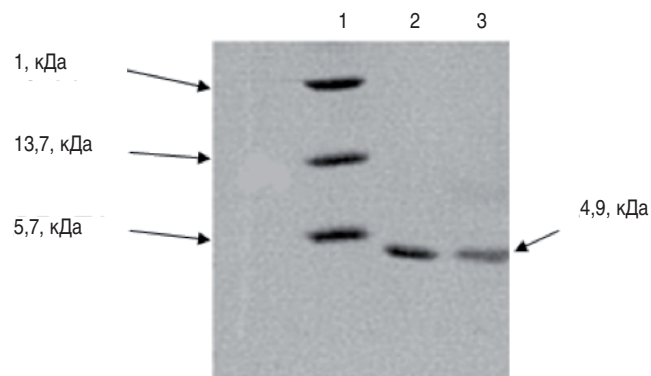


Рис. 1. Электрофореграмма очищенного бактериоцина: 1 – белки-маркеры; 2 – 1 мкг бактериоцина в пробе; 3 – 0,7 мкг бактериоцина в пробе.

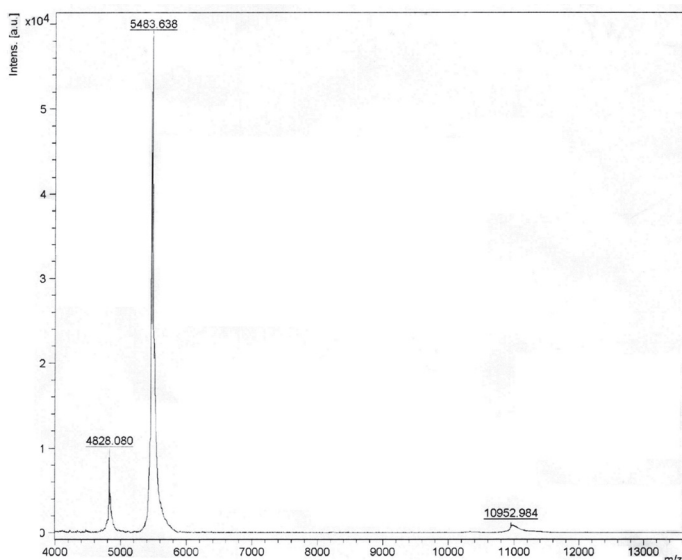


Рис. 2. Масс-спектрограмма бактериоцина *E. faecium* 1073. Энтероцин А – пик с молекулярной массой 4828 кДа; энтероцин В – пик с молекулярной массой 5483 кДа.

трацию бактериоцина в исходной КЖ в абсолютных единицах (мг/л). Для определения этой концентрации использовали уравнение Скоупса.

В 1974 г. Скоупс показал, что концентрацию очищенного белка любой молекулярной массы с точностью до 10% можно найти из следующего уравнения [8]:

$$A_{205}^{1 \text{ мг/мл}} = 27 + 120 \frac{A_{280}}{A_{205}}$$

Второе слагаемое суммы справа равно, как правило, 4, и, таким образом, $A_{205}^{1 \text{ мг/мл}} \approx 31 \pm 10\%$, где $A_{205}^{1 \text{ мг/мл}}$ – величина оптической плотности белка при длине волны 205 нм и концентрации белка 1 мг/мл. Уравнение Скоупса основано на том, что в коротковолновой ультрафиолетовой области при 205 нм поглощаются не только ароматические аминокислоты, но еще 5–6 аминокислот, встречающихся в аминокислотной последовательности белка гораздо чаще, чем тирозин и триптофан. В результате одна и та же концентрация разных белков дает примерно одну и ту же оптическую плотность. Уравнение Скоупса оказалось применимым и для длинноцепочечных пептидов – бактериоцинов [7] и пептида 1-40 из мозговой жидкости [9], а также для белков, в составе которых нет ароматических аминокислот. Поскольку уравнение Скоупса применимо для любого бактериоцина, оно примени-

мо и для суммы фаэцинов А и В. Концентрацию фаэцина в КЖ в мг/л находят следующим образом. Используя метод диффузии в гель, определяют процент выхода на любой желаемой стадии, в том числе и на конечной, где суммарный фаэцин электрофоретически чист. По уравнению Скоупса находят его концентрацию в мг/л на конечной стадии очистки, а затем, зная выход в процентах на этой стадии и принимая концентрацию в культуральной жидкости за 100%, находят эту концентрацию в мг/л.

Заключение

Анализ литературных данных и результаты собственных исследований свидетельствуют о близости физико-химических свойств большинства бактериоцинов. Близость физико-химических свойств пептидных бактериоцинов предполагает, что методы очистки с высоким выходом, предложенные в данной работе, могут быть пригодны и для других бактериоцинов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial 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

- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
- Borzenkov V, Surovtsev V, Dyatlov I. Obtaining Bacteriocin by Chromatographic Methods. *Adv Biosci Biotechnol.* 2014; 5:446-451.
- Jamaluddin N, Stuckey DC, Ariff AB, Faizal Wong FW. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(14):2453-2465. DOI: 10.1080/10408398.2017.1328658
- Баландин СВ, Финкина ЕИ, Нурмухамедова ЭК, Тагаев АА, и др. Биотехнологический способ получения и характеристика рекомбинантного антимикробного пептида Авицина А из *Enterococcus avium*. Доклады Российской академии наук. 2019;484(4):491-4.
- Дженкс В. В кн. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир; 1972, с. 304-305.
- Борзенков ВМ, Теймуразов МГ, Суровцев ВИ, Левчук ВП, Хатюшин ЮИ. Получение, очистка, физико-химические свойства бактериоцина *Enterococcus faecium*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(4):59-65.
- Евсегнеев СИ, Суровцев ВИ, Борзенков ВМ, Хатюшин ЮИ, Акимов ПС. Очистка пероксидазы хрена адсорбционной хроматографией. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2017;13(1):38-41.
- Scoups RK. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem.* 1974;59:277-82.
- Григорашвили ЕИ, Селиванова ОМ, Довидченко НВ, Джус УФ, Михайлина АО, Суворина МЮ, и др. Определение размера ядер сворачивания фибрилл, образованных рекомбинантным пептидом Аβ(1-40). *Биохимия.* 2016;82:710-20.

Таблица. Характеристика бактериоцина на различных стадиях очистки

Образец	Объем, мл	Удельная активность, у.е/мл	Общая активность, у.е.	Процент общей активности в КЖ
Начальная КЖ	1100	1600	176×10^4	100
кКЖ	193	8192	158×10^4	90
кКЖ-кл-фр	183	8192	150×10^4	85
Клетки	25,0	4096	102 400	6
Фрагменты	30,0	2048	61 440	3
Элюат ДЭАЭ-цел.	55	24 576	135×10^4	77
Элюат КМ-цел.	24	49 152	118×10^4	67

References

1. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
2. Borzenkov V, Surovtsev V, Dyatlov I. Obtaining Bacteriocin by Chromatographic Methods. *Adv Biosci Biotechnol.* 2014; 5:446-451.
3. Jamaluddin N, Stuckey DC, Ariff AB, Faizal Wong FW. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(14):2453-2465. DOI: 10.1080/10408398.2017.1328658
4. Balandin SV, Finkina EI, Nurmukhamedova EK, Tagaev AA, Ovchinnikova TV, Umnyakova ES, et al. Biotechnological method of preparation and characterization of recombinant antimicrobial peptide Avicin A from *Enterococcus avium*. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2019;484(1):42-44. (In Russian).
5. William P. Jencks. *Catalysis in chemistry and enzymology.* Moscow: "Mir" Publ.; 1972, pp. 304-305. (In Russian).
6. Borzenkov VM, Teimurazov MG, Surovtsev VI, Levchuk VP, Khatyushin Yul. Obtaining, purification, physicochemical properties of bacteriocin *Enterococcus faecium*. Yu.A.Ovchinnikov *Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology.* 2018;14(4):59-65. (In Russian).
7. Evsegneevev SI, Surovtsev VI, Borzenkov VM, Khatyushin YI, Akimov PS. Purification of horseradish peroxidase by adsorption chromatography. Yu.A.Ovchinnikov *Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology.* 2017;13(1):38-41. (In Russian).
8. Scoups RK. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem.* 1974;59:277-82.

9. Grigorashvili EI, Selivanova OM, Dovidchenko NV, Dzhus UF, Mikhailina AO, Suvorina MY, et al. Determination of size of folding nuclei of fibrils formed from recombinant A β (1-40) peptide. *Biochemistry (Moscow).* 2016;81(5):538-547. (In Russian).

Информация об авторах:

Левчук Владимир Павлович, научный сотрудник отдела биотехнологических технологий ФБУН «Государственный научный центр микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: levchuk@com.ru

Суровцев Владимир Иванович, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной биологии и микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Vladimir P. Levchuk, scientific researcher of the biotechnological's technology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Address: SRCAMB 142279 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: levchuk@com.ru

Vladimir I. Surovtsev, PhD, DSc (Chemistry) leading researcher, department of molecular biology and microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

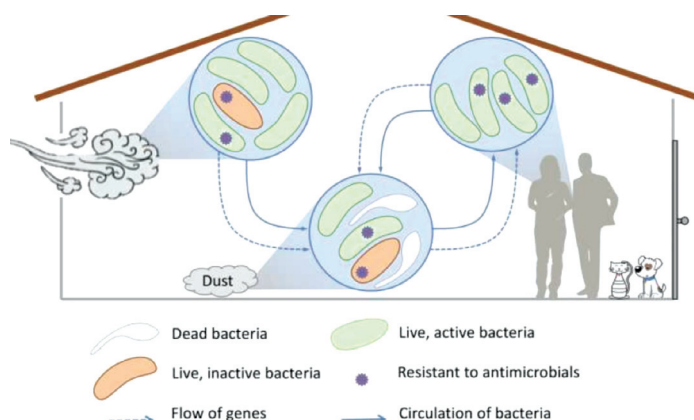
НОВОСТИ НАУКИ

Пыль разделяет гены устойчивости к антибиотикам

Исследователи из Северо-Западного университета впервые обнаружили, что бактерии, живущие в домашней пыли, могут распространять гены устойчивости к антибиотикам. Хотя большинство бактерий безвредны, исследователи считают, что эти гены могут потенциально распространяться на патогенные микроорганизмы, что затрудняет лечение инфекций.

Почему бактерии имеют общие гены? Они не могут справиться со стрессом от пребывания в помещении. Например, в помещении может быть слишком сухо и холодно без достаточного количества источников питания.

Микробы не способны справиться со стрессом, поэтому они делятся генетическими элементами с другими микроорганизмами.



*Stressed-out dust is sharing antibiotic resistance genes [Electronic resource].
 URL: <https://phys.org/news/2020-01-stressed-out-antibiotic-resistance-genes.html>*

Пути решения проблем выделения протеев в ветеринарии

А.А.Кремлева¹, Ю.А.Скоморина¹, О.В.Полосенко², А.П.Шепелин²

¹ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория», Москва, Российская Федерация;

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

Проведены сравнительные исследования качества питательных сред при изучении изолятов, выделенных из отходов переработки мясопродуктов животных и мяса механической обвалки. При оценке характера роста бактерий рода *Proteus* на питательных средах учитывались производительность, дифференцирующие и ингибирующие свойства. Особое внимание уделено новым высокоселективным питательным средам, испытанным в ветеринарной лаборатории. Установлено, что отечественная «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*», отличающаяся высокой производительностью и значительными ингибирующими свойствами, может применяться в ветеринарии при исследовании материала, контаминированного протеем при наличии сопутствующих бактерий.

Ключевые слова: ветеринария, питательные среды, протей, дифференцирующие свойства, селективность

Для цитирования: Кремлева А.А., Скоморина Ю.А., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Пути решения проблем выделения протеев в ветеринарии. Бактериология. 2020; 5(4): 25–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-25-29

Ways to solve problems of *Proteus* isolation in veterinary medicine

A.A.Kremleva¹, Yu.A.Skomorina¹, O.V.Polosenko², A.P.Shepelin²

¹Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory, Moscow, Russian Federation;

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

When studying isolates from waste of processing animal meat products and mechanically deboned meat the comparative analysis of nutrient media was done. The assessment of the growth of bacteria of the genus *Proteus* on the media based on such parameters as productivity, differentiating and inhibiting properties. Of special interest is a new highly selective nutrient media tested in the veterinary laboratory. It has been shown that the domestic differential diagnostic medium to isolate bacteria of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* is characterized by high productivity and significant inhibitory properties to be used in veterinary medicine to analyze any material contaminated with proteins along with concomitant bacteria.

Key words: veterinary medicine, nutrient media, *Proteus*, differentiating properties, selectivity

For citation: Kremleva A.A., Skomorina Yu.A., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Ways to solve problems of *Proteus* isolation in veterinary medicine. Bacteriology. 2020; 5(4): 25–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-25-29

Протей вызывает широкий спектр поражений у человека и животных. Наиболее достоверно доказана роль протеев в развитии инфекций мочевыводящих путей, бактериемий, гнойно-воспалительных поражений кожи и мягких тканей, гастроэнтеритов человека. *Proteus mirabilis* является одним из возбудителей уроинфекций у человека. Этот микроорганизм после *Escherichia coli* считается вторым по частоте видом бактерий, выделяемым из мочи. Попав в мочевыводящие пути, протей быстро колонизирует их, а инфицирование «роящимися» штаммами проявляется стремительным ростом инфекции [1].

Превалирование бактерий рода *Proteus* в организме сельскохозяйственных животных и птицы отрицательно сказыва-

ется на здоровье молодняка сельскохозяйственных животных и птиц, вызывая трудно поддающиеся лечению желудочно-кишечные заболевания на фоне выявления антибиотикорезистентных штаммов [2].

В этиопатогенезе кишечных расстройств у молодняка животных участвуют в основном *P. vulgaris* и *P. mirabilis*. Эти виды протей – наиболее часто выделяемые и патогенные для животных, в том числе птиц. Особенно восприимчивы к инфекции телята первых трех недель жизни, поросята до двухмесячного возраста [3].

Как санитарно-показательные микроорганизмы бактерии рода *Proteus* вместе с бактериями группы кишечной палоч-

Для корреспонденции:

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

Статья поступила 30.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

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

The article was received 30.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

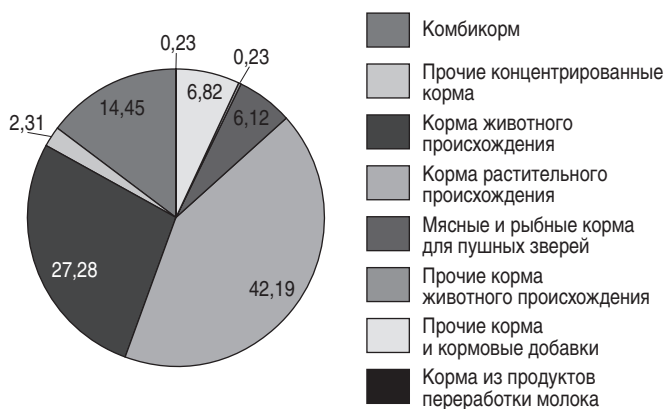


Рис. 1. Выявляемость бактерий рода *Proteus* (2019 г.), в %.

ки, энтерококками, сульфитредуцирующими клостридиями, колифагами применяют для санитарно-гигиенической оценки кормов для животных, почвы, воды открытых водоемов [4].

Обнаружение протей в пищевых продуктах и кормах свидетельствует о гнилостном процессе. Присутствие бактерий рода *Proteus* не допускается в кормах животного происхождения, однако, по данным отчетной информации лабораторий, положительные результаты по данному показателю зарегистрированы для других видов корма: комбикормов (14,45%), кормов растительного происхождения (42,19%), прочих кормов и кормовых добавок (6,82%) (рис. 1).

Основным нормативным документом по исследованию кормов для животных на данный показатель в РФ является «Методика индикации бактерий рода *Proteus* в кормах животного происхождения» 1981 г., требующая значительных изменений и дополнений. В настоящее время у специалистов аккредитованных лабораторий нет четкого понимания методологии выделения протеев, поэтому они вынуждены использовать в своей работе устаревшие методы, приборы и питательные среды [5].

Процесс выделения бактерий рода *Proteus* является длительным, что объясняется эффектом роения бактерий (вуалеобразный рост) на неселективных плотных питательных средах, а в случае ассоциативного роста с другими микроорганизмами их трудно получить в чистом виде. «Ползучий» рост на агаровой среде вызывают роящиеся Н-формы, а штаммы, неспособные к роению, образуют крупные с ровными краями колонии О-формы [1].

В ветеринарных лабораториях, лабораториях мясокомбинатов, а также в диагностических лабораториях при исследовании объектов внешней среды, кормов и продуктов питания для обнаружения протеев до сих пор используется метод Шукевича. При посеве материала, содержащего бактерии рода *Proteus*, в конденсационную воду свежескошенного мясо-пептонного агара через несколько часов на агаре отмечается роение микроба, «ползучий» нежный вуалеобразный рост [5]. Для количественного учета и получения чистой культуры первичный посев исследуемого материала производят на поверхность питательных сред Плоскирева или висмут-сульфитный агар.

Для выделения роящихся форм протеев применяют питательные среды, в состав которых вводят вещества, тормозящие ползучий рост культур протей.

Известна питательная среда селективного выделения бактерий родов *Proteus* и *Providencia*, в состав которой входит хлоргидрат-алкил-этил-глицин. Препараты этого ряда (соли диоктил-амино-этил-глицина) используются в качестве дезинфектантов, главным образом для обработки хирургического инструментария и перевязочного материала, а также в ряде случаев для обработки хирургических и травматических ран [6].

В настоящее время для подавления феномена роения используют среды, содержащие желчь / соли желчных кислот, а также хорошо просушенные среды, на которых возможно наблюдать рост протей без роения либо с очаговым роением. Известно использование различных химических веществ (карболовой кислоты, мочевины, ряда солей, антибиотиков) в составе питательных сред в качестве средств для подавления роения протеев [7, 8].

Из-за низкой селективности такие среды, как среда Эндо, агар с эозин-метиленовым синим, SS-агар, агар Плоскирева, обычно не справляются с вуалеобразным ростом протеев, так как роение затрудняет выделение других представителей энтеробактерий. Нероящиеся представители рода протеев обычно образуют более «нежные» колонии небольших размеров [7, 9].

В последнее время появилась тенденция к использованию новых питательных сред, позволяющих выделять широкий спектр энтеробактерий, принадлежащих к разным родам. Тем не менее использование высокоселективных питательных сред позволяет выявить на ранних стадиях наличие монокультуры в пробе и оценить относительное количество патогена [12, 13].

Поэтому важнейшим условием эффективности бактериологических исследований в ветеринарных лабораториях при первичном выявлении протеев при многообразии сопутствующих бактерий в исследуемом материале является использование высокоселективных питательных сред.

Цель исследования – сравнительная оценка качества дифференциально-диагностических питательных сред для выделения протеев по биологическим показателям.

Материалы и методы

В работе использовались питательные среды: «Питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл (агар Плоскирева-ГРМ)» (Оболенск), «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» (Оболенск), «Дифференциально-диагностический агар» (Биокомпас), «Питательная среда для выделения сальмонелл (Висмут-сульфит-ГРМ агар)» (Оболенск), «Питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар)» (Оболенск), «Триптиказо-соевый агар Tryptic soy agar Casein-peptone soymeal-peptone agar for microbiology USP» (Merck).

Для четкой оценки ростовых и ингибирующих свойств питательных сред были использованы культуры роящихся форм протеев. Для сравнительного анализа качества слабо- и высокоселективных дифференциально-диагностических питательных сред были использованы изоляты, выделенные из отходов переработки мясопродуктов животных и мяса механической обвалки: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *Staphylococcus*

aureus. Микробные взвеси готовили в 0,9%-м растворе хлорида натрия в концентрации, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-59-86П), соответствующего года выпуска (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ). Исходные взвеси доводили до нужных концентраций, используемых при исследованиях в соответствии с инструкциями по применению, МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [10] и ГОСТ 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред» [11].

Контроль качества питательных сред проводили по биологическим показателям: чувствительность, специфичность и селективность в соответствии с требованиями действующих нормативных документов [9, 11].

Результаты и обсуждение

Критерием для идентификации протеев является наличие у микроба совокупности основных признаков, характерных для данного вида микроорганизмов.

Представителей рода *Proteus* отличает разнообразие в появлении фенотипических признаков. Протеи образуют сероводород, но нередко его образование на плотных средах для энтеробактерий остается незаметным вследствие маскировки изменения pH среды при ферментации сахарозы (в случае *P. mirabilis*) и способности к роению [1].

Использование питательной среды широкого спектра применения без ингибиторов и индикаторов – Триптиказо-

соевого агара, не позволяющего убрать феномен роения протеев, – в данной работе оказалось нецелесообразно, поэтому среду применяли только для контроля посевной дозы эшерихий и стафилококков. Для контроля посевной дозы всех исследуемых изолятов бактерий (за исключением стафилококков) была использована питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар), позволяющая оценить количество выросших колоний на всех испытуемых средах.

Система индикации сероводорода, присутствующая в составе таких сред, как «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*», «Дифференциально-диагностический агар», позволяет визуализировать изоляты протеев по почернению колоний. Многокомпонентная среда XLD-агар позволяет также дифференцировать колонии не только представителей протеев, но и сальмонелл по образованию сероводорода и ферментации сахаров.

Для каждой селективной питательной среды был определен коэффициент производительности (Pr). Целью такого эксплуатационного критерия для питательных сред явилась проверка способности к удовлетворительному росту целевых штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* (морфологии колоний) на всех испытуемых питательных средах в соответствии с ГОСТ ISO 11133-2016.

В таблице представлена сравнительная оценка показателей производительности (Pr) питательных сред при посеве изолятов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* и селективности при посеве изолятов *E. coli* и *S. aureus*.

Таблица. Сравнительная оценка показателей производительности (Pr) и селективности питательных сред при посеве изолятов, выделенных из отходов переработки мясopодуlков животных и мяса механической обвалки

Питательная среда	Вид микроорганизма				
	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
Разведение	10 ⁶	10 ⁶	10 ²	10 ⁴	10 ⁴
Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i> (Оболенск)	113 КОЕ Pr = 113/91 = 1,26 круглые, гладкие, розовые, с темным центром	58 КОЕ Pr = 58/85 = 0,68 полупрозрачные, желтоватые колонии	Желтые колонии, окруженные зоной преципитации желтого цвета	Рост отсутствует	Рост отсутствует
Дифференциально-диагностический агар (Биокомпас)	71 КОЕ Pr = 71/91 = 0,78 наличие зон темно-коричневой окраски среды вокруг выросших колоний	41 КОЕ Pr = 41/85 = 0,48 Слабовыраженная зона серо-коричневой окраски среды вокруг выросших колоний	Желтые колонии, окруженные зоной преципитации желтого цвета	Единичные колонии	Рост отсутствует
Питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл сухая (агар Плоскирева-ГРМ)	108 КОЕ Pr = 108/91 = 1,18 прозрачные колонии, зона роста желтоватого цвета	87 КОЕ Pr = 87/85 = 1,02 прозрачные колонии, очаговое роение, зона роста желтоватого цвета		Колонии малинового цвета, круглые, выпуклые, гладкие**	Рост отсутствует
Питательная среда для выделения сальмонелл (Висмут-сульфит-ГРМ агар)	71 КОЕ Pr = 71/91 = 0,78 серо-коричневые колонии	68 КОЕ Pr = 68/85 = 0,80 колонии светло-зеленого цвета		Колонии темно-зеленого цвета**	Рост отсутствует
Питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий XLD агар* (Оболенск)	91 КОЕ колонии с черным центром	85 КОЕ колонии с черным центром		87 КОЕ **	Рост отсутствует
Tryptic soy agar Casein-peptone soymeal-peptone agar for microbiology USP (Merck)	Роение	Роение		99 КОЕ**	121 КОЕ**

* – XLD-агар дополнительно использован для контроля посевной дозы,

** – результат получен только при использовании разведения 10⁶.

Из таблицы видно, что «Дифференциально-диагностический агар» и «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» обладают хорошими ростовыми свойствами при выделении протеев, обеспечивают четкую дифференциацию патогенов по образованию сероводорода и имеют высокие ингибирующие свойства по отношению к *E. coli* и *S. aureus*. Тем не менее наибольшей производительностью при посеве бактерий рода *Proteus* отличилась «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*».

XLD-агар и висмут-сульфит-ГРМ агар по показателю производительности показали сравнимые результаты с вышеуказанными питательными средами, но поскольку они являются многокомпонентными средами и обеспечивают рост не только протеев, но и других представителей энтеробактерий, использование таких сред в ветлабораториях нежелательно, особенно при исследовании материала, контаминированного бактериями родов *Proteus* при наличии обильной сопутствующей микрофлоры. Применение в ветеринарной практике таких питательных сред, как среды Плоскирева, необходимо ограничивать, так как при росте протеев на среде может выявляться очаговое роение, мешающее интерпретации результатов.

Специфичность испытуемых питательных сред определяли с использованием трех изолятов культур: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. coli*. На среде Плоскирева-ГРМ протеи показали рост в виде гладких, блестящих, расплывчатых колоний, зона роста которых окрашивается в желтоватый цвет; на висмут-сульфит-ГРМ агаре через 24–48 ч – в виде изолированных колоний коричневого цвета, без изменения окраски среды (рис. 2, А, Б).

«Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» и «Дифференциально-диагностический агар»

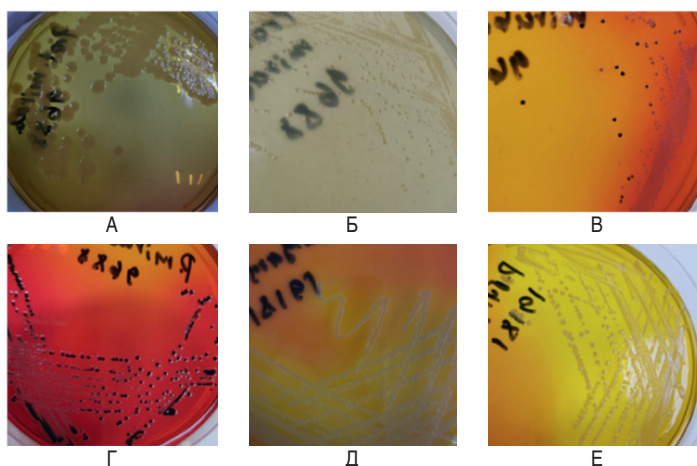


Рис. 2. Рост микроорганизмов на питательных средах: а) *P. mirabilis* на среде Плоскирева-ГРМ; б) *P. mirabilis* на висмут-сульфит-ГРМ агаре; в) *P. mirabilis* на «Дифференциально-диагностическом агаре»; г) *P. mirabilis* на «Дифференциально-диагностической питательной среде для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*»; д) *P. vulgaris* на «Дифференциально-диагностическом агаре»; е) *P. vulgaris* на «Дифференциально-диагностической питательной среде для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*».

обеспечивали визуальную идентификацию бактерий рода *Proteus* в виде изолированных колоний, а продуцирующие сероводород бактерии формировали колонии с черным центром и четкую дифференциацию колоний *P. mirabilis* и *P. vulgaris* (рис. 2, В–Е). При этом рост штамма *E. coli* подавлялся за счет внесения селективных добавок.

Таким образом, результаты сравнительных испытаний ряда плотных идентификационных сред для обнаружения и учета протеев показали, что по эксплуатационным критериям (производительность, селективность) наиболее приемлема для использования в ветеринарной практике «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*», обеспечивающая высокую селективность в отношении грамположительной и грамотрицательной сопутствующей микробной флоры и хороший рост при селективном выделении и визуальной идентификации протеев.

Заключение

Сравнительная оценка качества питательных сред по биологическим показателям на изолятах, выделенных из отходов переработки мясопродуктов животных и мяса механической обвалки, показала ряд преимуществ высокоселективных питательных сред в сравнении с традиционными средами Плоскирева, висмут-сульфитным агаром, при использовании которых возникали трудности при выделении микроорганизмов из-за роста роящихся форм протеев и роста сопутствующей микрофлоры.

Исследования показали, что «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» имела преимущество по сравнению с другими средами по показателю производительности и селективным свойствам. Кроме того, ее применение дополнительно позволило в предварительном фенотипическом тесте дифференцировать изоляты протеев по способности образовывать сероводород.

Таким образом, усовершенствование методов выделения и дифференциации микроорганизмов рода *Proteus* позволит повысить эффективность и сократить сроки исследований по сравнению с существующими методами, используемыми в ветеринарной практике. А достоверная лабораторная диагностика в ветеринарии, направленная на выявление и идентификацию бактерий рода *Proteus* из различных материалов, возможна только при наличии и грамотном использовании качественных питательных сред.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и ФГБУ ЦНМВЛ.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Поздеев ОК, Фёдоров РВ. Энтеробактерии. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, 720 с.
2. Васильев ДА, Феоктистова НА, Золотухин СН. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2017;2(38):70-5. DOI: 10.18286/1816-4501-2017-2-70-75
3. Протейная инфекция. Удмуртский ветеринарно-диагностический центр. Доступно по: <http://uvdc.ru/proteynaya-infekciya>
4. Литусов НВ, Сергеев АГ, Григорьева ЮВ, Ишутинова ВГ. Микрофлора окружающей среды и тела человека. Учебное пособие. Екатеринбург, 2008; 28 с.
5. Методика. Индикации бактерий рода «Протеус» в кормах животного происхождения. 1981 г. (Дата актуализации 01.01.2019) утв. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.
6. Мороз АФ, Газиумарова ЛД, Афиногенов ГЕ. Патент SU 560908 A1. Средство для селективного выделения бактерий родов протеев и провиденция. Доступно по: <https://findpatent.ru/patent/56/560908.html>. 2012-2020
7. Шепелин АП, Полосенко ОВ. Сравнительный анализ питательных сред для выделения протеев. Бактериология. 2019;3(4):31-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-31-37
8. Энтеробактерии. Руководство для врачей. Под ред. В.И.Покровского. М.: Медицина; 1985; с. 211-12.
9. Шепелин АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. М.: Династия; 2017; 231 с.
10. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008, 67 с.
11. ГОСТ ISO 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред. М.: Стандартинформ; 2016, 98 с.
12. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажермачева НИ, Ершова МГ, Поletaева ЕД. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563
13. Мартовецкий МН, Шепелин АП, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Полосенко ОВ. Разработка питательных сред для выделения протеев и клебсиелл. Инфекция и иммунитет. 2016;3(6):66.
6. Moroz AF, Gaziumarova LD, Afinogenov GE. Patent SU 560908 A1. A means for the selective isolation of bacteria of the genera *Proteus* and *Providencia*. Available at: <https://findpatent.ru/patent/56/560908.html>. 2012-2020 (In Russian).
7. Shepelin AP, Polosenko OV. Comparative analysis of nutrient media for proteus isolating. Bacteriology. 2019;3(4):31-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-31-37 (In Russian).
8. Enterobakterii [Enterobacteria]. Edited by V.I.Pokrovskii. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1985; pp. 211-12. (In Russian).
9. Shepelin AP, Dyatlov IA. Pitatel'nye sredy dlya enterobakterii [Nutrient media for enterobacteria]. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2017; 231 p. (In Russian).
10. Methods of control of bacteriological nutrient media. Methodological guidelines. MUK 4.2.2316-08. Moscow, 2008, 67 p. (In Russian).
11. GOST ISO 11133-2016 Microbiology of food, animal feed, and water. Preparation, production, storage and determination of performance characteristics of nutrient media. Moscow: "Standartinform" Publ.; 2016, 98 p. (In Russian).
12. Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Azhermacheva NI, Ershova MG, Poletaeva ED. Clinical trials of *Salmonella* enrichment medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
13. Martovetskii MN, Shepelin AP, Marchikhina II, Sholokhova LP, Polosenko OV. Razrabotka pitatel'nykh sred dlya vydeleniya proteev i klebsiell. Infektsiya i immunitet (Russian Journal of Infection and Immunity). 2016;3(6):66. (In Russian).

Информация об авторах:

Скоморина Юлия Александровна, заместитель руководителя, заведующая отделом бактериологии ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»
 Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжевая, 23
 Телефон: (495) 700-0137
 E-mail: yskomorina@inbox.ru

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

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

Information about authors:

Yulia A. Skomorina, deputy head, head of the department of bacteriology of the Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory
 Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation
 Phone: (495) 700-0137
 E-mail: yskomorina@inbox.ru

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

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

References

1. Pozdeev OK, Fedorov RV. Enterobakterii [Enterobacteria]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2007, 720 p. (In Russian).
2. Vasiliev DA, Feoktistova NA, Zolotukhin SN. Isolation and study of biological properties of *Proteus* genus bacteria. Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. 2017;2(38):70-5. DOI: 10.18286/1816-4501-2017-2-70-75 (In Russian).
3. Proteinaceous infection. Udmurt Veterinary and Diagnostic Center. Available at: <http://uvdc.ru/proteynaya-infekciya> (In Russian).
4. Litusov NV, Sergeev AG, Grigor'eva YuV, Ishutinova VG. Mikroflora okruzhayushchei sredy i tela cheloveka. Ekaterinburg, 2008; 28 p. (In Russian).
5. Methodology. Indications of bacteria of the genus "Proteus" in animal feed. 1981. (Update date 01.01.2019). (In Russian).

Роль дождевых червей в распространении сибирской язвы

Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов

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

В статье рассматривается вопрос вклада дождевых червей в распространение сибирской язвы в связи с длительной сохраняемостью возбудителя заболевания в почве скотомогильников. Представлены результаты оценки влияния дождевых червей на очищение почвы от возбудителя сибирской язвы и свойств микроорганизмов, выделенных из червей. Исследования показали, что под влиянием червей происходит снижение количества возбудителя сибирской язвы в почве на 30–50%, но оставшиеся споры не изменили своих свойств и сохранили все основные биологические и генетические факторы патогенности.

Ключевые слова: дождевые черви, возбудитель сибирской язвы, споровая культура, культивирование

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Роль дождевых червей в распространении сибирской язвы. Бактериология. 2020; 5(4): 30–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-30-34

The role of earthworms in the spread of anthrax

L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov

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

The article discusses the issue of the danger of earthworms in the spread of anthrax in connection with the long-term persistence of the causative agent of the disease in the soil of cattle burial grounds. The results of assessing the effect of earthworms on soil cleansing from the anthrax pathogen and the properties of microorganisms isolated from worms are presented. Studies have shown that under the influence of worms, the amount of anthrax pathogen in the soil decreases by 30–50%, but the remaining spores did not change their properties and retained all the main biological and genetic factors of pathogenicity.

Key words: earthworms, anthrax causative agent, spore culture, cultivation

For citation: Marinin L.I., Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. The role of earthworms in the spread of anthrax. Bacteriology. 2020; 5(4): 30–34. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-30-34

Длительное время дискутируется вопрос о роли дождевых червей в эпидемиологии сибирской язвы. Аристотель называл дождевых червей кишечником земли. И это действительно так: пропуская через свой кишечник землю и растительные остатки, черви обогащают почву. Доказано, что черви питаются бактериями и грибами, пищеварительный тракт червей представляет собой особое место обитания микроорганизмов в почве. В кишечнике червей ускоряется размножение почвенных бактерий и прорастают споры грибов, черви способствуют расселению в почве микромицетов и сапрофитных бактерий, которые продуцируют антимикробные препараты.

Впервые о роли червей при сибирской язве высказался Л.Пастер. Он отметил обилие дождевых червей у зарытых трупов животных и предположил, что дождевые черви вы-

носят возбудителя сибирской язвы из глубины почвы на ее поверхность [1]. Р.Кох опровергал это заявление Л.Пастера. О.Bollinger проверил данное положение в эксперименте [2]. На пастбищах в Баварских Альпах, где часто встречались заболевания сибирской язвой, он добыл 72 червя. Тщательно очистив их, он растер червей в стерильной воде и полученную массу ввел животным (кроликам, морским свинкам и белым мышам). В одном случае получил гибель от сибирской язвы. На основании проведенных исследований был сделан вывод о правильности теории Л.Пастера.

В ответ на экстремальные условия среды обитания у дождевого червя сформировалась уникальная иммунная система, которая представлена антибиотической, ферментативной системой, комплексом специфических иммунных клеток и комплементарных белков [3].

Для корреспонденции:

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских 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. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Статья поступила 24.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Leonid I. Marinin, MD, PhD, leading researcher laboratory of anthrax microbiology department of particularly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

The article was received 24.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

Находясь в почве, дождевой червь выкапывает целую систему ходов. Отмечено, что большой выползок делает ходы до 2,5 м в глубину. Дождевой червь захватывает кусочки почвы губами и проглатывает ее. Проглотив достаточное количество земли, червь выползает на поверхность и выделяет остатки пищи. За сутки он пропускает через себя почву в количестве, примерно равном его массе. Поэтому он вполне может, например, вынести наверх споры бактерий, находящиеся как на его поверхности, так и в кишечнике. Было установлено, что в кишечнике червей споры могут сохраняться жизнеспособными до 6 мес. (срок наблюдения) [4]. Вынесенные споры длительное время остаются жизнеспособными на почве и на траве. Животные, поедая такую траву, заражаются сибирской язвой. Так, в 2006 г. в Пензенской области заболели животные, которых кормили сеном, заготовленным на территории незадокументированного скотомогильника. В республике Мордовия пало 55 животных, инфицирование которых произошло вследствие использования зеленого корма, заготовленного на территории в непосредственной близости от скотомогильника. Возбудитель сибирской язвы был выделен из образцов сена и травы, скошенной около скотомогильника. При проведении вынужденного убоя и контакте с мясом больных животных инфицировано 6 человек [5].

Черви могут быть опасны при непосредственном контакте с ними людей. Описаны случаи развития кожной формы сибирской язвы у любителей рыбалки [6].

Нами было проведено изучение влияния дождевых червей на очищение почвы от возбудителя сибирской язвы и свойств микроорганизмов, выделенных из червей. Для этого был отработан метод определения воздействия дождевых червей на сибиреязвенный микроб в почве. Попытки использования природных дождевых червей, особенно больших выползков, не дали положительных результатов – при содержании в лабораторных условиях черви погибали. Поэтому в работе использовали красных калифорнийских дождевых червей. Калифорнийский красный червь – новая порода дождевого червя *Eisenia foetida*, выведенная в Университете штата Калифорния в 1959 г. в результате гибридизации различных пород дождевого червя.

Цель работы: изучить роль дождевых червей в эпидемиологии сибирской язвы.

Материалы и методы

Калифорнийские дождевые черви (рис. 1) были получены из Центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов. Поступивших в лабораторию калифорнийских червей помещали в пластмассовый кювет, содержащий около 5 кг гумусной почвы с pH 7,0–7,5.

Питательный субстрат готовили заранее: слой плодородной огородной почвы, слой пищевого субстрата, сверху слой почвы. Приготовленный субстрат увлажняли: комочек субстрата после сжатия в руке и разжимания кулака не должен рассыпаться.

Готовность субстрата определяли следующим способом. На влажный субстрат клали десяток червей. Если черви в течение нескольких минут заползали в субстрат, значит, он готов к заселению червями. Червей заселяли вместе с пита-

тельным субстратом, равномерно распределяя их по поверхности. Верх емкости закрывали двумя слоями марли.

Для кормления червей использовали растительные остатки: кожуру бананов, кофейную гущу, спитой чай. Подкормку давали понемногу через 2–3 дня с условием, чтобы переработанный субстрат не накапливался.

Уход за червями сводился к поддержанию температуры, рыхлению почвы и поливу. Одно из ведущих условий в жизнедеятельности красных калифорнийских червей – влажность субстрата. Они очень чувствительны к колебаниям влажности, особенно к ее снижению. Также старались поддерживать оптимальную для червя температуру – 16–28°C. Черви не любят яркий свет, поэтому ящик помещали в затемненное место. Время от времени перемешивали субстрат для того, чтобы улучшить доступ кислорода.

В качестве питательных сред для культивирования *Bacillus anthracis* использовали LB-агар/бульон (по Луриа–Бертани), мясопептонный агар/бульон, а также дифференциально-диагностические питательные среды: среду с сорбитом и бромтимоловым синим и среду с фенолфталеинфосфатом натрия. В агаровые среды добавляли полимиксин из расчета 100 мкг/см³. Капсулообразование культур определяли на бикарбонатно-сывороточном агаре (по Green).

В работе использована споровая суспензия *B. anthracis* штамм 71/12 (второй вакцины Ценковского) из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ.

Свойства культур определяли по существующим методикам [7, 8].

Результаты и обсуждение

По отработанной методике провели оценку эффективности использования дождевых червей при элиминации из почвы споровых и вегетативных форм сибиреязвенного микроба.

Калифорнийских дождевых червей в количестве 50 штук помещали в контейнер с землей (около 1 кг). В навески сухих опилок (100 г) вносили 10 см³ споровой суспензии *B. anthracis* с концентрацией 3×10^8 спор/см³. Затем опилки вносили в контейнер с почвой и тщательно перемешивали. В разные временные интервалы из хранившихся контейнеров отбирали образцы почвы, взвешивали их и добавляли



Рис. 1. Красный калифорнийский дождевой червь.

Таблица 1. Влияние дождевых червей на содержание микроорганизмов *B. anthracis* в почве

Срок хранения проб почвы, сутки	Номер пробы			
	1	2	3	4
0	$6,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
7	$6,2 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$
14	$6,0 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$
28	$4,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
42	$4,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$
56	$3,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
63	$4,4 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
77	$2,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$
90	$3,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$

*Количество микроорганизмов в 1 г почвы в пробах.

равное по весу количество физиологического раствора. Колбы помещали в шейкер и встряхивали в течение одного часа. Затем отбирали 1 см³ суспензии и титровали методом десятикратных разведений.

Из соответствующих разведений делали высевы суспензии на плотные и в жидкие питательные среды. После 24 ч инкубирования при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ определяли характер роста на питательных средах визуально или под малым увеличением микроскопа, обращали внимание на характер колонии на агаре, прозрачность бульона и вид осадка. Подсчитывали количество колоний, выросших на плотной питательной среде. Полученные результаты представлены в табл. 1.

На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что в присутствии дождевых червей происходит снижение в почве количества сибиреязвенных бацилл (от 30 до 50%).

Одновременно изучили влияние дождевых червей на свойства возбудителя сибирской язвы, находящегося в почве [8]. В почву внесли спорую суспензию штамма *B. anthracis* и поместили калифорнийских червей. Через 20 и 30 дней наблюдения отобрали по 5 крупных особей, которых отмыли от почвы и растерли в ступках с песком. Суспензии высевали на дифференциально-диагностические питательные среды с полимиксином. В результате на 20-е и 30-е сутки после начала эксперимента были выделены культуры *B. anthracis*.

Были изучены биологические свойства выделенных культур – характер роста в жидкой и на плотной питательных средах, вирулентность для беспородных белых мышей. Из

клеток полученных культур выделили ДНК и поставили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с видоспецифическими праймерами [9].

При выращивании на плотных и жидких питательных средах выделенные штаммы проявляли типичные культурально-морфологические признаки (характер роста, морфология колоний и клеток). На агаризованной питательной среде вырастали плоские колонии различной величины, сероватого или серовато-белого цвета, сухие, матовые, шероховатые R- и RRO-форм.

В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали крупные (от 1,0–1,3 до 3–10 мкм) грамположительные палочки с обрубленными или слегка закругленными концами, расположенные в цепочках.

В жидкой питательной среде отмечали рост на дне пробирки отдельными хлопьями или хлопком («комочек ваты»), бульон оставался прозрачным.

Выделенные культуры лизировали специфическими сибиреязвенными бактериофагами «Гамма А-26» и «Fah-VНИИВВиМ».

На специальных питательных средах (по Green) при культивировании в атмосфере углекислого газа вырастали крупные, выпуклые, блестящие, полупрозрачные гладкие колонии слизистой (мукоидной) консистенции. Процент капсулообразующих клеток у вновь выделенных культур не изменился по сравнению с исходной культурой и находился на уровне 90%.

Вирулентность выделенных из червей культур практически не имела отличий от величин исходного штамма – показатели LD₅₀ для белых мышей составили от 10 до 50 спор.

Провели генотипирование выделенных из червей штаммов. Из исходной культуры (штамма 71/12) и полученных культур выделили ДНК по методу щелочной денатурации Birnboim H.C., Doly J. [10]. ДНК выделяли из вегетативных клеток, выращенных в LB-бульоне с качанием в течение 16 ч.

На рис. 2 представлена элекрофореграмма полученных ДНК. Видно, что выделенные культуры не отличались от исходного штамма, на дорожках 2 и 3 визуализируется одна из двух сибиреязвенных плазмид.

Выделенные ДНК использовали в качестве матриц в ПЦР со специфическими праймерами на нуклеотидные последовательности плазмидной локализации возбудителя сибирской язвы. Были использованы пары праймеров, гомологичные участкам нуклеотидных последовательностей плазмид *B. anthracis* (табл. 2). Праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол».

Таблица 2. Праймеры, использованные в ПЦР с культурами, выделенными от червей

Наименование	5' - 3' -последовательность	Ожидаемый размер фрагмента, п.о.
F1 pXO ₂ -	5' - GTCTTCTCGCACTATCAAGGCTCAATG -3'	355
R1 pXO ₂ -	5' - CTGCATTATTATCAATTGTTATATCAGG -3'	
F1lef-	5' - CCCTACACTAATTAACATAACCAAATTGG -3'	365
R1lef-	5' - GCTGTTACTAAACATGACATACTAATTAC -3'	
F1pag-	5' - CCTGTGCTTGAAACTAATATCGTAGAC -3'	375
R1pag-	5' - GTATACAGCATACACAATCTATTGAAGG -3'	
F1edema	5' - CTATAGCCTGTGAGGAGGATATAGCAAATAG -3'	405
R1edema	5' - CAGCTGAACTTTATCAACTTAGAATCTC -3'	

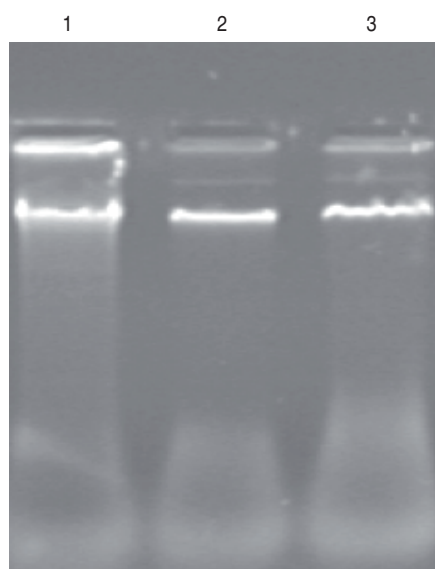


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов ДНК, выделенных из клеток *B. anthracis*. 1 – ДНК из исходной культуры *B. anthracis* 71/12; 2 – ДНК из культуры после 20 дней инкубации; 3 – ДНК из культуры после 30 дней инкубации.

На рис. 3 представлена электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами к генам, кодирующим факторы патогенности возбудителя сибирской язвы: rXO_2 – праймер к капсульному оперону (355 п.о.), *lef* – праймер к гену летального фактора сибиреязвенного токсина (365 п.о.), *pag* – праймер к гену протективного антигена сибиреязвенного токсина (375 п.о.), *edema* – праймер к гену отечного фактора сибиреязвенного токсина (405 п.о.).

Из приведенных данных следует, что выделенные на 20-й и 30-й день после начала эксперимента культуры не изменили своих свойств после контакта с калифорнийскими червями – сохранились все генетические детерминанты вирулентности. Пробы ДНК исходной культуры *B. anthracis* 71/12 и выделенных от червей субкультур амплифицировались с праймерами *pag*, *lef*, *edema* к последовательности генов плазмиды токсинообразования rXO_1 и праймерами rXO_2 к

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

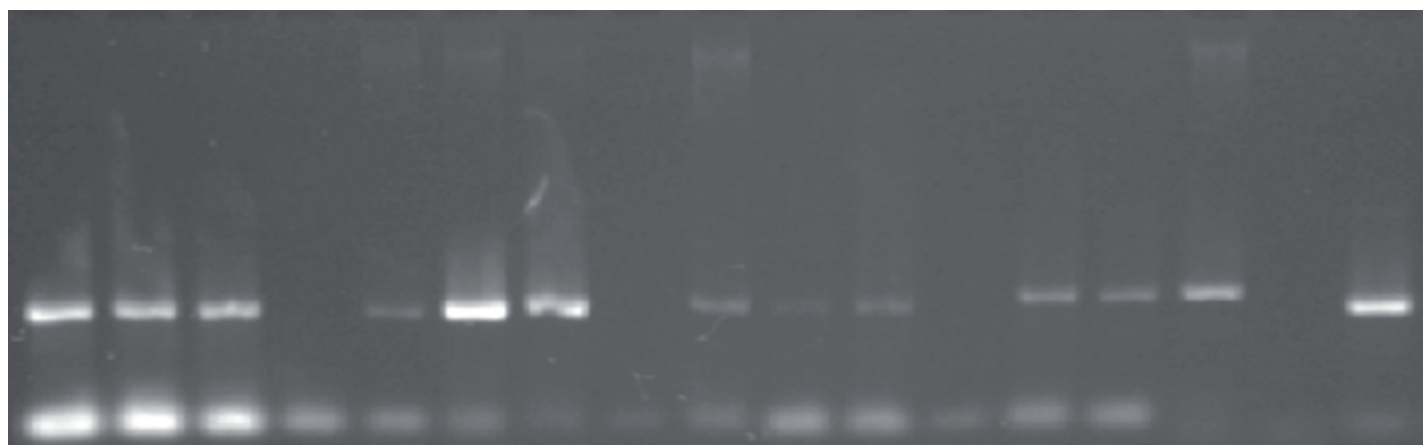


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР с соответствующими праймерами к капсульному оперону и компонентам токсина препаратов ДНК *B. anthracis*. 1 – ДНК из культуры после 20 дней инкубации; 2 – ДНК из культуры после 30 дней инкубации; 3 – ДНК из исходной культуры *B. anthracis* 71/12; 4 – H_2O с праймером rXO_2 ; 5 – ДНК из культуры после 20 дней инкубации; 6 – ДНК из культуры после 30 дней инкубации; 7 – ДНК из исходной культуры *B. anthracis* 71/12; 8 – с праймером *lef*; 9 – ДНК из культуры после 20 дней инкубации; 10 – ДНК из культуры после 30 дней инкубации; 11 – ДНК из исходной культуры *B. anthracis* 71/12; 12 – с праймером *pag*; 13 – ДНК из культуры после 20 дней инкубации; 14 – ДНК из культуры после 30 дней инкубации; 15 – ДНК из исходной культуры *B. anthracis* 71/12; 16 – H_2O с праймером *edema*; 17 – М-маркер 362 п.о.

последовательности генов плазмиды капсулообразования сибиреязвенных штаммов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что пребывание сибиреязвенной культуры в организме дождевого червя не привело к утрате ни одной из двух плазмид, детерминирующих капсуло- и токсинообразование.

Заключение

Исследования показали, что под влиянием червей происходит снижение количества возбудителя сибирской язвы в почве на 30–50%, но оставшиеся споры не изменили своих свойств и сохранили все основные биологические и генетические факторы патогенности. Поэтому вынесенные червями на поверхность почвы споры длительное время остаются жизнеспособными на почве и на траве, представляя опасность для людей и животных.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial 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

1. Пастер Л. Об этиологии сибирской язвы. Избр. труды. Изд. акад. наук СССР. Т. II. М., 1960, с. 547-558.
2. Bollinger O. Arbeiten aus dem pathologisch. Institut München, 1886, p. 5-13.
3. Стом ДИ, Балаян АЭ, Полехина СВ, Быбин ВА. Способ тестирования активности препаратов, полученных из дождевых червей. Патент на изобретение 2377561, 2008 - ГОУ ВПО Иркутский государственный университет. – 5 с.

4. Schuch R, Fischetti VA. The Secret Life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. PLoS ONE. 2009;4(8):e6532. DOI: 10.1371/journal.pone.0006532
5. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА., Герасимов ВН. Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения. М.: «Династия»; 2017, 216 с.
6. Тамиранов А. В двух шагах от сибирской язвы. Fa tamiranov.livejournal.com.352611.html
7. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. Под ред. Л.И.Маринина, И.А.Дятлова. М.: «Гигиена»; 2009, 304 с.
8. Шишкова НА, Платонов МЕ, Мокриевич АН, Светоч ТЭ, Маринин ЛИ. Изучение генетического разнообразия штаммов сибиреязвенного микроба из коллекции ГНЦ ПМБ. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;2(104):60-5.
9. Шишкова НА, Маринин ЛИ, Мокриевич АН. Влияние дождевых червей на находящиеся в почве споры сибиреязвенного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. 2012;1(111):66-69.
10. Плазмиды. Под ред. К.Харди. Методы. М.: Мир; 1990, с. 11-18.
9. Shishkova NA, Marinin LI, Mokrievich AN. Interaction between earthworms and soil-inhabiting anthrax microbe spores. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2012;1(111):66-69. (In Russian).
10. Plazmidy. Edited by K.Khardi. Metody. Moscow: "Mir" Publ.; 1990, p. 11-18. (In Russian).

Информация об авторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

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

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

Information about authors:

Nina A. Shishkova, PhD (Biology), leading researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

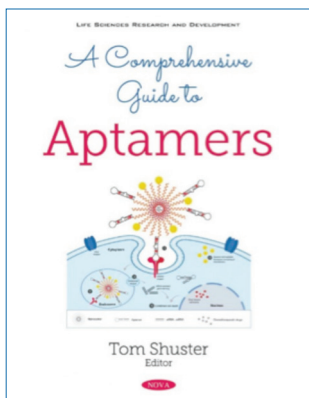
Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, head of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

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

References

1. Paster L. About the etiology of anthrax. Vol. II. Moscow, 1960, p. 547-558. (In Russian).
2. Bollinger O. Arbeiten aus dem pathologisch. Institut München, 1886, p. 5-13.
3. Stom DI, Balayan AE, Polekhina SV, Bybin VA. A method for testing the activity of preparations obtained from earthworms. The patent for the invention 2377561, 2008 - Irkutsk State University, 5 p. (In Russian).
4. Schuch R, Fischetti VA. The Secret Life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. PLoS ONE. 2009;4(8):e6532. DOI: 10.1371/journal.pone.0006532
5. Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA., Gerasimov VN. Sibireyazvennye skotomogil'niki: problemy i resheniya. Moscow: «Dynasty»; 2017, 216 p. (In Russian).
6. Tamiranov A. V dvukh shagakh ot sibirskoi yazvy. Fa tamiranov.livejournal.com.352611.html (In Russian).
7. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, et al. Metody izucheniya biologicheskikh svoystv vozbuditelya sibirskoi yazvy. Edited by L.I.Marinin, I.A.Dyatlov. Moscow: «Gigiena» Publ.; 2009, 304 p. (In Russian).
8. Shishkova NA, Mokrievich AN, Platonov ME, Svetoch TE, Marinin LI. Study of the genetic diversity of the anthrax microbe strains from the collection of SRC AMB. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2010;2(104):60-5. (In Russian).

НОВОСТИ НАУКИ



A Comprehensive Guide to Aptamers ed. T. Shuster // NY: Nova Science Publishers, Inc. – 2019. – 168 p. – ISBN 978-1-53616-293-6 (ebook 978-1-53616-294-3)

Книга фокусируется на последних достижениях в разработке аптамеров нуклеиновых кислот в качестве альтернативных систем доставки терапевтических олигонуклеотидов. Кроме того, обсуждаются ключевые примеры направленной доставки наиболее распространенных терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот, включая небольшие интерферирующие РНК, РНК с короткими шпильками, микроРНК и антисмысловые олигонуклеотиды для ряда нарушений.

Получение кроличьих гипериммунных сывороток к *Haemophilus influenzae*

Я.Б.Нескородов¹, Я.В.Мишуткина¹, С.Г.Марданлы^{1,2}

¹ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Российская Федерация

Представлены актуальные данные о заболеваемости, вызванной *Haemophilus influenzae*, и проблемах диагностики. Описаны подходы и результаты получения кроличьих гипериммунных сывороток к *H. influenzae*.
Ключевые слова: *Haemophilus influenzae*, гипериммунная сыворотка, агглютинация

Для цитирования: Нескородов Я.Б., Мишуткина Я.В., Марданлы С.Г. Получение кроличьих гипериммунных сывороток к *Haemophilus influenzae*. Бактериология. 2020; 5(4): 35–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-35-38

Obtaining bunny hyperimmune serum for *Haemophilus influenzae*

Ya.B.Neskorodov¹, Ya.V.Mishutkina¹, S.G.Mardanly^{1,2}

¹CJSC «EKOLab», Elektrogorsk, Russian Federation;

²State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Russian Federation

This brief report describes the approaches and results of obtaining rabbit hyperimmune sera for *Haemophilus influenzae*.
Key words: *Haemophilus influenzae*, hyperimmune serum, agglutination

For citation: Neskorodov Ya.B., Mishutkina Ya.V., Mardanly S.G. Obtaining bunny hyperimmune serum for *Haemophilus influenzae*. Bacteriology. 2020; 5(4): 35–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-35-38

Гемофильная палочка (*Haemophilus influenzae*) представляет собой неподвижные грамтрицательные плеоморфные коккобациллы, покрытые оболочкой. Данная бактерия может выделяться как в капсульных, так и в бескапсульных формах. Бактерия способна продуцировать эндотоксин, который представляет собой липополисахарид клеточной стенки. Исходя из химического строения и антигенных свойств полисахаридной капсулы, выделяют 6 серотипов *H. influenzae*: A, B, C, D, E, F.

От 90 до 95% населения являются носителями данной бактерии [1], а у 5% из них высевается вирулентный штамм серогруппы В. Этот штамм способен вызывать различные формы инфекций (ХИБ-инфекции), которыми поражаются преимущественно дети до 4 лет. Инфекции бывают как локализованные (например, отит, остеомиелит, артрит и т.п.), так и генерализованные (например, септицемия, менингит, эпиглоттит и т.д.). Также встречаются и относительно редкие формы гемофильной инфекции: перитонит, гепатит, уретрит. Несмотря на наличие высокоэффективных антибакте-

риальных препаратов, уровень смертности при инфекции гемофильной палочки может достигать 11% [2, 3].

Наблюдения показывают, что с 1996 г. количество случаев ХИБ-инфекции увеличилось в три раза [4], однако из-за сравнительной редкости данного заболевания настороженность врачей по данному поводу низкая, что является одной из причин сложной диагностики [1]. Развитие болезни при ХИБ-инфекции протекает тяжело: у каждого третьего пациента с эпиглоттитом развивалась пневмония и трахеобронхит, а каждый четвертый больной, в связи с угрозой асфиксии, нуждался в продлении назотрахеальной интубации [4].

Особенно тяжелые формы ХИБ-инфекция приобретает в условиях гнойного бактериального менингита, который может встречаться в разных возрастных группах. Летальность этого заболевания чрезвычайно высока: даже при наличии своевременного начатого лечения показатель смертности может достигать до 26%.

Диагностика ХИБ-инфекции осуществляется микробиологическим лабораторным исследованием с применением

Для корреспонденции:

Нескородов Ярослав Борисович, кандидат биологических наук, старший микробиолог НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, 1
E-mail: ekolab_neisseria@mail.ru

For correspondence:

Yaroslav B. Neskorodov, PhD (Biological Sciences), Senior Microbiologist at the Scientific and Production Association «Immunology», CJSC «EKOLab»

Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
E-mail: ekolab_neisseria@mail.ru

The article was received 18.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

Статья поступила 18.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

метода посева со слизистой на «шоколадный» агар и последующим серологическим анализом [4]. Для данной процедуры традиционно используют метод посева микроорганизмов из цереброспинальной жидкости пациентов. Данный подход является «золотым стандартом» диагностики данной инфекции, однако он имеет ряд серьезных ограничений. Во-первых, данный метод чрезвычайно чувствителен к наличию антибактериальной терапии на догоспитальном этапе: наличие такой терапии значительно снижает шансы получить пригодные для анализа бактериальные колонии. Во-вторых, для правильной работы метода необходимо точно соблюдать правила забора и транспортировки материала и условия культивирования проб (не менее 48 ч) [1].

Следует учитывать, что *H. influenzae* требовательна к условиям культивирования. Невозможно получить стабильный рост культуры, если в ней отсутствуют такие факторы роста, как гемин (фактор X) и никотинамидадениндинуклеотид (НАД, или фактор V) [5].

Из-за низкой настороженности врачей относительно инфекции гемофильной палочки и трудоемкой процедуры лабораторной диагностики подобных заболеваний актуальной становится разработка «некультуральных» методов идентификации гнойного бактериального менингита, таких как диагностика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), И-ПЦР-диагностика и метод латекс-агглютинации [6].

Различные варианты метода диагностики бактериальной инфекции на основе ПЦР являются чрезвычайно точными и информативными, однако данный подход невозможно осуществить в полевых условиях непосредственно у постели больного, так как для этого требуется целый комплекс оборудования и высококвалифицированный персонал. На этом фоне разработка и применение диагностических наборов на основе латексных частиц представляется наиболее оправданной стратегией, поскольку для проведения диагностических мероприятий с применением этого метода медработник не должен обладать каким-либо специализированным оборудованием, а взятие образцов у пациента методом пункции входит в сферу его профессиональных знаний.

Диагностические наборы на основе латексных частиц представляют собой суспензии сферических полистирольных латексных частиц различного диаметра (0,81...1 мкм), покрытых специфическими антителами к гемофильной палочке. Размер латексных сфер важен для производства диагностических наборов, так как при использовании суспензий с частицами минимального размера усложняется процедура визуального учета реакции, а применение сфер максимального размера существенно увеличивает частоту неспецифических реакций.

Суть метода латексной агглютинации заключается в том, что частицы латекса, покрытые антителами, агглютинируют в присутствии бактериальных антигенов, содержащихся в цереброспинальной жидкости пациента. Агглютинат хорошо виден невооруженным глазом. При отрицательных результатах реакции суспензия латекса остается гомогенно-мутной, без глыбок агглютината и участков просветления. Проведение данного анализа занимает приблизительно 10 мин, а сам механизм реакции не требует наличия живых бактерий или их ДНК в образцах [7].

Важным этапом в производстве диагностических наборов на основе полистирольных латексов является получение специфических антител. Для сенсibilизации частиц латекса пригодны гипериммунные сыворотки, полученные при иммунизации лабораторных животных. Повышению специфичности реакции латексной агглютинации и уменьшению числа ложноположительных и перекрестных реакций способствует применение очищенных иммуноглобулиновых фракций.

Гипериммунные, или специфические, сыворотки представляют собой сыворотки крови животных, систематически иммунизированных бактериальными антигенами. Гипериммунные сыворотки содержат антитела, которые обладают специфическим сродством к бактериальным токсинам, бактериям или вирусам, против которых были иммунизированы животные.

Целью данной работы было получение гипериммунных кроличьих сывороток к *H. influenzae* серогруппы В с выраженной реакцией агглютинации к соответствующим серотипам возбудителя.

Материалы и методы

Работы по получению антигенов, бактериальных сорбентов для удаления гетерологичных антител проводились с соблюдением требований асептики в боксах ламинарных шкафов [8]. Музейные культуры производственных штаммов *H. influenzae* хранились при -70...-80°C в криобирках.

В компании ЗАО «ЭКОлаб» для получения кроличьих гипериммунных сывороток к гемофильной палочке серотипов А, В, С, D, E, F использовали бактериальные штаммы, полученные из Уникальной научной установки «Коллекция Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова». Культивирование штаммов производилось на «шоколадном» агаре собственного производства с применением бараньей крови. Бактериальную массу для производства вакцины наращивали на чашках Петри. Смыв бактериальной культуры производили физиологическим раствором. Сыворотку обеззараживали формалином. Очистку бактериальной культуры от формалина проводили методом повторного центрифугирования и отмывки бактериальной массы стерильным физиологическим раствором. Полученную бактериальную массу разбавляли, ориентируясь по стандарту мутности, и хранили в замороженном состоянии. Контроль серологического профиля полученной вакцины осуществляли с помощью коммерческих диагностических наборов *H. influenzae* компании SSI Diagnostica (www.ssidiagnostics.com/), Дания.

Для восстановления бактерий из замороженного состояния использовали теплую (37°C) питательную среду – бульон Хоттингера. Процедура восстановления была следующая: криобирку снаружи обрабатывали дезинфицирующим средством (спирт 70%) и помещали в асептические условия ламинарного бокса. Через 5 мин пробирку вскрывали с соблюдением правил асептики. Прокаленным над пламенем спиртовки и охлажденным пинцетом извлекали 2–3 «бусины» и переносили их в 2 мл теплого бульона Хоттингера. В жидком бульоне бактерии культивировали в течение 12 ч. После этого жидкую бактериальную культуру наносили на шоколадный агар (по 200 мкл) и равномерно распределяли по поверхности среды с помощью шпателя Дригальского. На шоколадном

агаре культивирование бактерий продолжалось в течение 24 ч, после чего полученные бактериальные колонии смывали физиологическим раствором и формализировали.

Длительность процесса обеззараживания бактериального смыва формалином составляла 24 ч. Очистку от раствора формалина осуществляли центрифугированием. Центрифугирование проводили в стерильных емкостях при 2000 об./мин в течение часа. Всю надосадочную жидкость удаляли, а оставшийся плотный осадок кремового цвета разбавляли физиологическим раствором до мутности, соответствующей 100 млрд микробных тел в 1 мл. Для получения требуемой мутности использовали соответствующие стандарты мутности.

Животные (кролики) содержались в виварии компании ЗАО «ЭКОлаб» согласно действующим в РФ нормам содержания лабораторных животных [9].

Животных вакцинировали 1 мл вакцины в холку по схеме «7 через 7», где между инъекциями допускается временной промежуток в 6–7 дней, а количество инъекций равно семи.

После вакцинирования животные находились под наблюдением. В случае выявления каких-либо отклонений (снижение подвижности, кожные поражения, различные выделения и т.д.) животных выбраковывали. Животные содержались индивидуально. Каждая клетка была снабжена биркой, на которой указывалась информация о партии кроликов, антигене, календаре иммунизаций. Тотальный забор крови у животных проводился по утвержденной процедуре [10].

Собранную кровь животных фракционировали. Прозрачную часть сыворотки сливали в стерильные флаконы, а мутную – центрифугировали. Фракцию над осадком объединяли с прозрачной частью сыворотки. Консервацию сыворотки проводили хлороформом.

Одноименные сыворотки, полученные от различных животных, объединяли в серию. Объединенной серии, прошедшей контроль, присваивали номер серии.

Серийная сыворотка проходила процедуру фильтрующей стерилизации. Перед фильтрацией сыворотки повторно центрифугировали для осаждения механических частиц и взвеси осадка денатурированного белка. Фильтрацию осуществляли в ламинарном шкафу в асептических условиях. При завершении процедуры фильтрации осуществляется контроль pH сыворотки, который должен быть в диапазоне от 7,0 до 7,5. В случае отклонения от заданного диапазона сыворотка бракуется. Если в результате проверки выявляли бактериальную зараженность полученного раствора, то допускали его повторную фильтрацию.

Результаты и обсуждение

В настоящее время были получены гипериммунные кроличьи сыворотки к *H. influenzae* серогруппы В, демонстрирующие выраженную реакцию агглютинации к соответствующим серотипам. Выраженная реакция агглютинации сохранялась при разведении нативной сыворотки 1:512.

В нашей работе мы отмечаем сложность при создании гипериммунных кроличьих сывороток к *H. influenzae*, выразившуюся в слабой реакции агглютинации и зависимости интенсивности формирования хлопьев от серогруппы бактерий. Так, например, в нашей работе было показано, что наиболее выраженная реакция агглютинации

происходит с бактерией серогруппы В, а с серогруппами А и Е, несмотря на то, что вакцинация проводилась в одинаковых контролируемых условиях, реакция агглютинации была слабо выражена и не могла в полной мере применяться для диагностики. Создание латексных диагностических систем может быть решением данной проблемы.

В настоящее время из полученных гипериммунных сывороток были экстрагированы и очищены иммуноглобулиновые фракции. Проводятся работы по получению диагностических наборов на основе полистирольных латексов.

Информация о финансировании

Финансирование работы проводилось из собственных средств компании.

Financial support

The work was financed from the company's own funds.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Кашуба ЭА, Рычкова ОА, Дроздова ТГ, Булаева ТИ, Петров ВГ, Кухтерин АА, Прыкина ОВ. Сепсис, вызванный *Haemophilus influenzae* типа В. Детские инфекции. 2003;4:54-6.
2. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. N Engl J Med. 1997 Oct 2;337(14):970-6. DOI: 10.1056/NEJM199710023371404
3. Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CV. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. J Infect Dis. 1990 Dec;162(6):1316-23. DOI: 10.1093/infdis/162.6.1316
4. Гоева СВ, и др. О целесообразности вакцинации против *Haemophilus influenzae* типа В. Вопросы современной педиатрии. 2006;S.
5. Herbert MA, Hood DW, Moxon ER (ed.). *Haemophilus influenzae* protocols. – Springer Science & Business Media, 2003.
6. Баркова ИА, Барков АМ, Викторов ДВ. Метод иммуно-ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019;3:110-17. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-3-110-117
7. Нартов ПВ, Попов ОИ. Окружающая среда как фактор развития гнойных бактериальных менингитов. Довкілля та здоров'я. 2007;4 (43).
8. Марданлы СГ, Симонов ВВ, Авдонина АС. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ; 2017, 208 с.
9. Марданлы СГ, Киселёва ВА, Мишуткина ЯВ. Содержание и использование животных-продуцентов биологического сырья. Монография. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ; 2019, 88 с.
10. Полоз АИ, Финогенов АЮ. Методические указания по гуманной эвтаназии животных. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского»; 2008.

References

1. Kashuba EA, Rychkova OA, Drozdova TG, Bulaeva TI, Petrov VG, Kukhterin AA, Pryakhina OV. Sepsis, vyzvannyi *Haemophilus influenzae* tipa B. Children's Infections. 2003;4:54-6.

2. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med.* 1997 Oct 2;337(14):970-6. DOI: 10.1056/NEJM199710023371404

3. Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CV. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. *J Infect Dis.* 1990 Dec;162(6):1316-23. DOI: 10.1093/infdis/162.6.1316

4. Goeva SV, et al. O tselesoobraznosti vaktsinatsii protiv *Haemophilus influenzae* tipa V. *Current Pediatrics (Voprosy Sovremennoi Pediatrii).* 2006;S.

5. Herbert MA, Hood DW, Moxon ER (ed.). *Haemophilus influenzae* protocols. – Springer Science & Business Media, 2003.

6. Barkova IA, Barkov AM, Viktorov DV. Method of immuno-PCR in diagnostics of bacterial and viral infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;3:110-17. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-3-110-117

7. Nartov PV, Popov OI. Okruzhayushchaya sreda kak faktor o razvitiy gnoinykh bakterial'nykh meningitov. *Довкілля та здоров'я.* 2007;4 (43).

8. Mardanly SG, Simonov VV, Avdonina AS. Proizvodstvo naborov reagentov dlya klinicheskoi laboratornoi diagnostiki immunokhimicheskimi metodami. *Orekhovo-Zuevo: Editorial and publishing Department of the University;* 2017, 208 p.

9. Mardanly SG, Kiseleva VA, Mishutkina YaV. Soderzhanie i ispol'zovanie zhivotnykh-produtsentov biologicheskogo syr'ya. *Orekhovo-Zuevo: Editorial and publishing Department of the University;* 2019, 88 p.

10. Poloz AI, Finogenov AYu. Metodicheskie ukazaniya po gumannoi evtanazii zhivotnykh. Minsk: RUP «Institut eksperimental'noi veterinarii im. S.N.Vyshelesskogo; 2008.

Информация об авторах:

Мишуткина Яна Владимировна, кандидат биологических наук, директор НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»
 Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
 E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Мардалы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет»
 Адрес: 142611, Орехово-Зуево, ул. Зеленая, 22
 Телефон: (49643) 3-17-45
 E-mail: ekolab-sekretar@mail.ru

Information about authors:

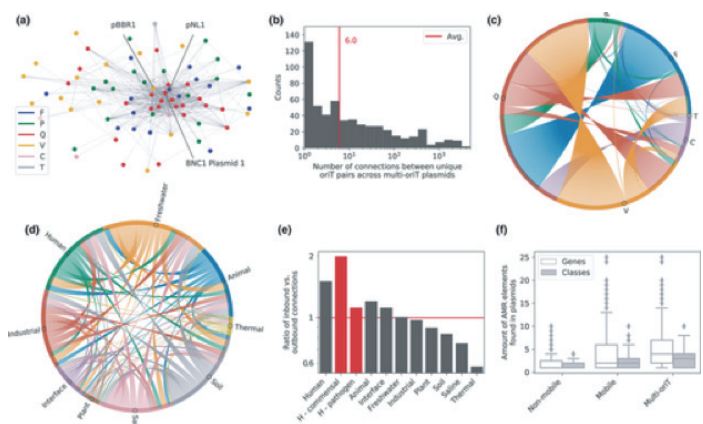
Yana V. Mishutkina, PhD (Biological Sciences), Director of at the Scientific and Production Association «Immunology» CJSC «EKOLab»
 Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
 E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Seifaddin G. Mardanly, MD, PhD, DSc, professor, academician AMTS, professor of the department of pharmacology, State University of Humanities and Technology
 Address: 22 Zelenaya str., Orekhovo-Zuevo, Moscow region, 1142611 Russian Federation
 Phone: (49643) 3-17-45
 E-mail: ekolab-sekretar@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии становятся устойчивыми к антибиотикам намного быстрее, чем мы думаем

Устойчивость к противомикробным препаратам представляет большую опасность для человечества, отчасти из-за широко распространенного горизонтального переноса генов плазмид посредством конъюгации. Для раскрытия основ переноса резистентности и для разработки прогнозных мер по ограничению распространения резистентности необходимо моделирование переноса плазмиды. Однако главным ограничением в современном понимании плазмид является неполная характеристика механизмов переноса конъюгативной ДНК, которая скрывает реальный потенциал переноса плазмид в природе. Предполагается, что субстраты плазмидного происхождения кодируют определенные структурные свойства ДНК, которые могут облегчить обнаружение этих областей в больших наборах данных, и разработать процедуру выравнивания на основе структуры ДНК для типирования субстратов переноса, которая превосходит подходы, основанные на последовательностях. Выявлены тысячи предполагаемых субстратов для переноса ДНК, что показывает, что подвижность плазмид может быть в два раза выше и охватывать почти в два раза больше видов хозяев, чем это известно в настоящее время. Более половины всех предполагаемых мобильных плазмид содержат средства для мобилизации с помощью систем конъюгации, принадлежащих к разным мобильным группам, которые могут гипотетически связывать ранее ограниченные диапазоны хозяев в экологических средах обитания в надежную сеть переноса плазмид. Обнаружено, что эта гипотетическая сеть способствует передаче устойчивости к противомикробным препаратам от генетических резервуаров окружающей среды к патогенам человека, что может быть важным фактором наблюдаемого быстрого развития устойчивости у людей и, таким образом, важным направлением будущих профилактических мер.



Zrimec J. Multiple plasmid origin-of-transfer regions might aid the spread of antimicrobial resistance to human pathogens. Microbiologypen. 2020 Dec;9(12):e1129. DOI: 10.1002/mbio3.1129

Адгезины патогенных иерсиний

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

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

В род *Yersinia* входят 26 видов, три из которых патогенны для человека: *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*, вызывающие иерсиниоз и псевдотуберкулез – инфекции с преимущественно желудочно-кишечной симптоматикой, и *Yersinia pestis* – возбудитель чумы. Патогенные иерсинии экспрессируют белки, опосредующие прикрепление к клеткам-хозяина, способствующие инвазии или уклонению от его иммунной системы, позволяя возбудителям пролиферировать и распространяться внутри макроорганизма. Кроме того, эти виды служат моделями для изучения эволюции факторов патогенности бактерий. Вирулентность патогенных штаммов *Yersinia* зависит от наличия во внешней мембране молекул с адгезивными свойствами. Некоторые из них, такие как белки YadA и Inv энтеропатогенных видов, а также рН 6 антиген *Y. pestis*, были достаточно полно изучены. Однако полногеномное секвенирование выявило множество других адгезинов, присутствующих в данных микроорганизмах, функции которых только начинают исследоваться. В настоящем обзоре кратко суммируются текущие знания об адгезинах иерсиний, их функциях и предполагаемой роли в инфекционном процессе. Особое внимание уделено одному из семейств β-цилиндрических белков внешней мембраны иерсиний, связанных с патогенностью бактерий, а именно белкам-авто-транспортерам.

Ключевые слова: адгезия, патогенез, фактор патогенности, *Yersinia*

Для цитирования: Трунякова А.С., Вагайская А.С., Дентовская С.В. Адгезины патогенных иерсиний. Бактериология. 2020; 5(4): 39–51. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-39-51

Adhesins of pathogenic *Yersinia*

A.S.Trunyakova, A.S.Vagaiskaya, S.V.Dentovskaya

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

The genus *Yersinia* includes 26 species, three of which are pathogenic to humans: *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, which cause yersiniosis and pseudotuberculosis, infections with mainly gastrointestinal symptoms, and *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Pathogenic *Yersinia* express proteins that mediate attachment to host cells, facilitate invasion or evasion of the host's immune system, allowing pathogens to proliferate and spread within the host. In addition, these species, and *Y. pestis* serve as models for studying the evolution of pathogenicity factors in bacteria. The virulence of pathogenic *Yersinia* strains depends on the presence of molecules with adhesive properties in their outer membrane. Some of them, such as the YadA and Inv proteins of enteropathogenic species, as well as the pH 6 antigen of *Y. pestis*, have been adequately studied. However, the whole-genome sequencing has revealed many other adhesins present in these microorganisms, which functions are just under investigation. This review briefly summarizes current knowledge about *Yersinia* adhesins, their functions and their putative role in the infectious process. Particular attention is paid to one of the families of β-cylindrical proteins of the outer membrane of *Yersinia*, associated with the pathogenicity of bacteria, namely, autotransporter adhesins.

Key words: adhesion, pathogenesis, pathogenic factor, *Yersinia*

For citation: Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., Dentovskaya S.V. Adhesins of pathogenic *Yersinia*. Bacteriology. 2020; 5(4): 39–51. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-39-51

Род *Yersinia* в настоящее время насчитывает 26 видов, три из которых имеют медицинское значение. *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* вызывают у людей желудочно-кишечные заболевания средней тяжести [1]. Один из них – *Y. pseudotuberculosis* – принято считать прародителем *Yersinia pestis*. Дивергенция видов произошла около

15–20 тыс. лет назад [2]. *Y. pestis* является этиологическим агентом чумы – широко распространенного зоонозного заболевания, одной из самых разрушительных болезней в истории человечества [3].

Патогенность микроорганизмов – сложное явление, реализуемое посредством множества разных механизмов.

Для корреспонденции:

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0117
E-mail: trunyakova@obolensk.org

Статья поступила 23.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Alexandra S. Trunyakova, junior researcher of laboratory for plague microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: trunyakova@obolensk.org

The article was received 23.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

Однако существует несколько общих стратегий, используемых патогенами для поддержания жизнеспособности и преодоления защитных барьеров хозяина, в числе которых обеспечение прочной адгезии к его клеткам. Патогенность представителей всех трех видов иерсиний зависит от адгезивных свойств бактерий, а молекулы адгезинов, опосредующие прикрепление к тканям хозяина, являлись предметом исследований в течение нескольких десятилетий. Первыми из обнаруженных адгезинов иерсиний были *Yersinia adhesin A* (YadA) и инвазин (invasin – InvA), идентифицированные еще в 1980-х гг. [4–6]. Доступность полногеномных последовательностей бактерий позволила в последующем выявить ряд новых генов иерсиний, потенциально кодирующих белки с адгезивными свойствами (таблица). В дополнение к этому создание рекомбинантных молекул адгезинов в сочетании с использованием методов структурной биологии привело к лучшему пониманию молекулярных механизмов бактериальной адгезии. В зависимости от структуры, путей сборки и механизмов экспорта адгезины подразделяются на несколько разных классов, большинство из которых представлено у иерсиний [7].

Белки системы секреции V типа

Белки системы секреции типа V, или автотранспортеры (АТ), составляют самую большую группу секретируемых белков грамотрицательных бактерий, делящуюся на пять классов: Va–Ve [7]. У патогенных иерсиний обнаружили автотранспортные адгезины, относящиеся к типам Va, Vc и Ve (рисунок). Белки типа Va представляют собой классические АТ, состоящие из N-терминального сигнального пептида, варибельного функционального passenger-домена и C-терминального мембранного β-домена. Сигнальный пептид обеспечивает транспорт белка в периплазму, где шапероны иерсиний Skp, SurA и DegP защищают его от протеаз и удерживают в развернутом состоянии до момента доставки до сборочного молекулярного комплекса (β-barrel assembly machinery – BAM-комплекс) наружной мембраны [7]. β-домен белка образует транспортный канал, через который passenger-домен секретируется через наружную мембрану. Белки типа Vc, или тримерные АТ-адгезины (ТАА), по своей структуре аналогичны классическим автотранспортерам, но могут функционировать только в виде тримеров [8]. Passenger-домены ТАА обычно состоят из шарообразного головного домена, за которым следует спиральный стебель. АТ типа Ve, или «обратные АТ», имеют структуру, аналогичную классическим АТ, но порядок их доменов обратный, то есть β-домен является N-терминальным для passenger-домена [9].

Классические АТ, известные под общим названием Yaps (*Yersinia autotransporter proteins*), были обнаружены при анализе геномов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза *in silico*. У *Y. pestis* существует 13 открытых рамок считывания, кодирующих предполагаемые функциональные белки АТ (YapA, YapB, YapC, YapF, YapE, YapG, YapH, YapJ, YapK, YapL, YapM, YapN, YapV).

Установлено, что ген *yapA* нефункционален у штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *orientalis* из-за наличия точечной мутации в сигнальной последовательности [10], но экспрессируется в штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *medievalis* KIM [11]. У штаммов чумного микроба ген *yapB* является псевдогеном из-за усечения транслокаторного домена, однако в хромосоме *Y. pseudotuberculosis* обнаружили два смежных интактных паралога гена *yapB* [10]. Ген *yapN* есть только у штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *medievalis* KIM [11].

Автотранспортеры типа Va. Белок YapC *Y. pestis* обладает высокой степенью гомологии с адгезином TibA энтеротоксигенных *Escherichia coli*. Установлено, что продукт *yapC* может играть важную роль в развитии инфекционного процесса при чуме, опосредуя прикрепление как к мышинным макрофагоподобным клеткам, так и к эпителиоподобным клеткам человека. Кроме того, экспрессия белка YapC чумного микроба на поверхности *E. coli* приводила к появлению аутоагрегации – феномена, связанного с вирулентностью у штаммов иерсиний. Белок YapC также участвует в образовании биопленок [12]. Однако делеция гена *yapC* у штамма *Y. pestis* KIM5 не приводила к снижению адгезии к клеткам RAW264.7 или HEp-2 и утрате способности к аутоагрегации и образованию биопленок, что может быть связано с обнаруженным низким уровнем экспрессии гена *yapC in vitro*.

Белок YapE является единственным белком-автотранспортером, обнаруженным кроме чумного микроба у

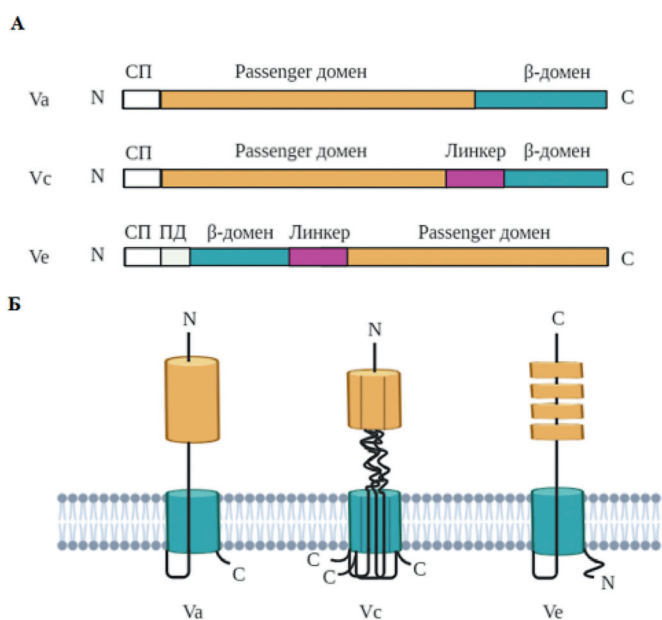


Рисунок. Организация доменов и модели топологии белков системы секреции типа Va, Vc и Ve.

(А) Доменная организация белков АТ типа Va (например, YapE), Vc (например, YadA) и Ve (например, Int, Inv), содержащих на N-конце сигнальный пептид (СП), который облегчает Sec-зависимый транспорт через внутреннюю мембрану. В белках АТ типа Vc СП связан с длинным passenger-доменом, который соединен с C-концевым β-бочкообразным доменом через короткий линкер. В белках АТ типа Ve порядок доменов отличается: СП соединен с периплазматическим доменом (ПД), за ним следует β-бочкообразный домен, который соединен с C-концевым passenger-доменом через линкер.

(Б) Классические АТ-белки типа Va являются мономерными. C-концевой β-бочкообразный домен (голубой) встроен во внешнюю мембрану. N-концевой passenger-домен (желтый) переносится на бактериальную поверхность и остается прикрепленным к β-цилиндру. Системы секреции типа Vc образуют гомотримеры, где каждый мономер вносит вклад в 4 β-цепи с образованием одного тримерного 12-цепочечного β-цилиндра. Система секреции типа Ve включает белки АТ инвертированного типа, такие как Int и Inv. У инвертированных АТ типа Ve β-бочкообразный домен расположен на N-конце и сливается с passenger-доменом на C-конце.

Адгезины патогенных иерсиний

Таблица. Адгезины патогенных для человека <i>Yersinia</i>						
Адгезин	Функция	Наличие у видов ^{a)}			Ссылки	
		<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>		
Автотранспортные адгезины						
Тип Va	YapA	Неизвестна	+ (Q9F292)	x (Q667Z2)	–	[10]
	YapB1	Неизвестна	o	x (Q667Z0)	–	[10]
	YapB2	Неизвестна	–	x (Q667Z1)	–	[10]
	YapC	Аутоагглютинация, связывание с эпителиальными клетками и макрофагами, образование биопленок	+ (Q9F290)	x (Q66DI5)	–	[18]
	YapE	Связывание с эукариотическими клетками, аутоагрегация	+ (Q9F288)	x (Q664E)	x (A1JSQ7)	[14]
	YapF	Частично защищает мышей от гибели при подкожном заражении	+ (Q9F287)	x (Q665R2)	–	[10]
	YapG	Неизвестна	+ (Q9F286)	x (Q665P5)	–	[15]
	YapH	Неизвестна	+ (Q9F285)	x (Q666F5)	–	[10]
	YapJ	Неизвестна	+ (Q0WGA9)	–	–	[10]
	YapK	Неизвестна	+ (Q0WJZ8)	x (Q66FH2)	–	[10]
	YapL	Неизвестна	+ (Q7CJH7)	x (Q668J2)	–	[10]
	YapM	Неизвестна	+ (Q0WIL1)	x (Q667C1)	–	[10]
	YapN	Неизвестна	+ (Q0WID7)	x (A0A0U1QUE7)	–	[10]
	YapV	Взаимодействует с фактором полимеризации актина N-WASP	+ (Q8CZT5)	x (Q666H3)	–	[16]
YapX	Неизвестна	o	x (Q666H2)	–	[17]	
Тип Vc	YadA	Связывание с компонентами внутриклеточного матрикса, эпителиальными клетками, макрофагами и нейтрофилами, опосредует устойчивость к сыворотке и аутоагглютинацию	o	+ (K7ZVF1)	+ (P31489)	[134]
	YadB	Способствует выживанию при внутрикожном пути введения	+ (Q7CHJ4)	+ (Q66CJ1)	–	[43]
	YadC	Способствует выживанию при внутрикожном пути введения	+ (Q7CHJ5)	+ (Q66CJ0)	–	[43]
Тип Ve	InvA	Адгезия и инвазия эпителиальных клеток через β -интегрины	o	+ (P11922)	+ (A1JT35)	[46]
	Ifp/InvB	Адгезия и инвазия эпителиальных клеток	o	+ (Q66C38)	x (A0A0H3NUI2)	[57]
	InvC/Iip	Адгезия и инвазия клеток хозяина	+ (Q7CFY4)	+ (A0A0H3AYF9)	–	[55]
	InvD	Неизвестна	–	x (A0A0H3B1G5)	–	[55]
Фимбриальные адгезины						
Шаперон/ашерные фимбрии	Psa/Myf	Связывание с галактозой и фосфатидилхолином, образование биопленок	+ (P31527)	+ (Q56983)	+ (P33408)	[80]
	Caf	Защита от фагоцитоза, связывание с интерлейкином-1 β	+ (P26949)	–	–	[92]
	y0348–0352	Адгезия к макрофагам	+ (Q7CKZ7)	x (Q66G26)	–	[108]
	y0561–0563	Образование биопленок	+ (Q7CKQ0)	x (Q66FH7)	–	[104]
	y1858–1862	Адгезия к макрофагам	+ (Q7CIW9)	x (Q669U8)	x (A1JM00)	[104]
	y1869–1873	Адгезия к макрофагам	+ (Q7CIW3)	x (Q669W0)	–	[108]
	y2388–2392	Неизвестна	+ (Q9ZC30)	x (Q66B61)	x (A1JTK2)	[104]
	y3478–3480	Неизвестна	+ (Q7CGJ4)	x (Q665Z6)	–	[104]
Пили IV типа	Pil	Неизвестна	–	+	+	[112]
	Fip	Формирование микроколоний	o	x (Q665Z1)	+ (A1JQP1)	[114]
Белки с β -цилиндрической (бочкообразной) структурой						
Семейство OmpX	Ail	Адгезия к эпителиальным клеткам и их инвазия, способствует повышению устойчивости к сыворотке	+ (Q0WCZ9)	+ (Q56957)	+ (P16454)	[58]
	OmpX	Неизвестна	+ (Q8D0S1)	x (Q669E5)	x (A1JU26)	[62]
	y2304	Неизвестна	x (Q7CI97)	x (Q66AY4)	–	[62]
	y2446	Неизвестна	x (Q7CI12)	x (Q66BP0)	–	[62]

Семейство омитинов	Pla	Активация плазминогена, инактивация комплемента, адгезия и инвазия эпителиальных клеток	+ (E5GAD2)	–	–	[74]
	Другие адгезины					
	МAM7	Связывание с фибронектином и фосфатидной кислотой	x (Q8D0N9)	+ (A0A0H3B2K4)	x (A1JM37)	[117]
	ПГА	Образование биопленок; продуцируется локусом <i>hmsHRSF</i>	+ (Q56939)	+ (Q66B31)	x (A1JSA3)	[59]
	ЛПС	Связывание с DC-SIGN-рецептором на антигенпрезентирующих клетках	+	+	+	[121]

а) В случае отсутствия информации о наличии гена конкретного адгезина в литературе для поиска в одном или нескольких геномах рассматриваемого вида использовали биоинформационный анализ (BLAST). Для интактных генов включили код доступа UniProt для репрезентативной последовательности (в скобках). В случае фимбриальных адгезинов код доступа относится для ашерного белка. Для пилей IV типа код доступа относится к основной субъединице пилина. Для PGA код доступа предназначен для белка HmsH, а для ЛПС код доступа не включили.
+ – ген присутствует и экспрессируется;
x – ген присутствует (статус экспрессии неизвестен);
o – псевдоген;
– – ген отсутствует.

Y. pseudotuberculosis и *Y. enterocolitica* [10]. Часть функционального домена YapE после транслокации остается связанной с внешней мембраной бактерии, другая часть пептида подвергается протеолитическому расщеплению с помощью протеазы OmpT или активатора плазминогена Pla и высвобождается в межклеточное пространство, проявляя адгезивную активность [13]. Инактивация гена *yapE* у штаммов *Y. pestis* снижает колонизацию тканей мутантным штаммом при бубонной чуме. Показана данная роль белка *Y. pestis* в связывании бактерии с клетками млекопитающих и аутоагрегации [14]. Однако YapE *Y. enterocolitica* не обладает аутоагрегационной активностью и не подвергается протеолитическому расщеплению [14]. YapG чумного микроба, так же как и YapE, подвергается протеолитическому расщеплению активатором плазминогена и высвобождается в культуральную среду [10, 13]. Другие АТ локализованы на поверхности *Y. pestis*, что показано с помощью метода доступности протеазам и иммунофлуоресцентной микроскопии [11]. YapG не играет роли в вирулентности штаммов *Y. pestis* ни при бубонной, ни при легочной чуме, и его функции еще предстоит выяснить [15].

Гены *yapK*, *yapJ* и *yapV* чумного микроба являются близкими паралогами. При этом ген *yapV* присутствует у штамма *Y. pestis* KIM, но отсутствует у *Y. pestis* CO92 [16]. Кроме того, в геноме *Y. pseudotuberculosis* обнаружили ген АТ *yapX* – паралог *yapKJV*, который является псевдогеном у всех штаммов *Y. pestis* [17]. Изучение профилей транскрипции генов, кодирующих АТ, показало низкие уровни экспрессии в условиях роста *in vitro*, которые повышаются *in vivo* [18]. Гены *yapJ* и *yapK* подвергаются позитивной регуляции в ходе инфекционного процесса при бубонной и легочной чуме [18], хотя их точные функции еще не ясны [19]. Аминокислотная последовательность белка YapV чумного микроба на 85% подобна последовательности автотранспортера IcsA *Shigella flexneri* [16]. Установлено, что YapV *Y. pestis*, подобно IcsA шигелл, способен взаимодействовать с белком N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein), участвующим в полимеризации актина. Показано, что белки YapV, YapJ и YapK связываются с молекулами внеклеточного матрикса (extracellular matrix – ECM), а YapV, в меньшей степени, YapK взаимодействуют, кроме того, с клетками альвеолярного эпителия [17].

Ген *yapM*, по-видимому, входит в состав оперона из четырех котранскрибируемых генов, продукты трех из которых предположительно могут участвовать во взаимодействии с глюкозаминогликанами, входящими в состав внеклеточного матрикса [10]. Локализация белка YapM на внешней мембране бактериальной клетки подтверждается его доступностью для экзогенно добавленных протеаз (продемонстрировано при экспрессии в *E. coli* и *Y. pestis*) и антител (продемонстрировано для *Y. pestis*). Установлено, что *yapM* – единственный ген, подвергающийся отрицательной регуляции в условия низкого содержания железа при температурах 26°C и 37°C. Белок YapM – единственный из автотранспортеров, синтез которого не индуцируется в легких в любую временную точку и индуцируется в лимфатических узлах на низком уровне через 48 ч после начала инфекции [10]. Учитывая профиль экспрессии гена *yapM*, можно предположить, что его продукт не играет значимой роли в организме млекопитающего и важен для чумного микроба при колонизации блох, где возбудитель чумы растет при более низких температурах в крови, богатой железом [10].

Следует отметить, что некоторые из генов, предположительно кодирующих белки-автотранспортеры, были идентифицированы в ходе проведения генетических скринингов как кодирующие продукты, потенциально играющие роль в инфицировании организма хозяина или обладающие иммуногенными свойствами [20–23].

Например, установлено, что одним из генов, подвергающихся положительной регуляции в транскриптом чумного микроба при блокообразовании блох *Xenopsylla cheopis*, является ген *yapL* *Y. pestis*. Однако сконструированный $\Delta yapL$ -штамм не проявлял дефектов в образовании биопленки *in vitro*, инфицировании и блокообразовании блох и, по-видимому, не является единственным для проявления данного фенотипа чумного микроба [23].

С использованием технологии поиска антигенов, индуцирующихся *in vivo*, выявили гены чумного микроба, подвергающиеся позитивной регуляции при бубонной чуме на модели кроликов [20]. Из обнаруженных авторами 25 генов три относились к автотранспортным белкам системы секреции V типа: YapK (YPO1627), YapG (YPO0587) и YapH (YPO1004). Т.о., данные белки антигенны, и их позитивная регуляция *in vivo* может отражать важность данного типа поверхности и

внеклеточно расположенных молекул для выживания *Y. pestis* в ходе инфицирования организма хозяина. Белки системы секреции V типа высокоиммуногенны и вследствие этого могут индуцировать развитие протективного иммунитета, а также использоваться как серологические маркеры инфицирования чумным микробом.

При поиске антигенов, способных стимулировать протективный T-клеточный ответ, методом реверсивной вакцинологии В. Li et al. [22] обнаружили, что белок-автотранспортер YarpF может частично защитить мышей от гибели при подкожном введении 200 LD₅₀ вирулентного штамма *Y. pestis*. По мнению авторов, данный белок может быть рекомендован в качестве компонента при конструировании субъединичной вакцины.

Функции некоторых автотранспортных белков, таких как YarpL, YarpH, YarpN, на данный момент не известны.

Автотранспортеры типа Vc. YadA, являющийся прототипом ТАА, присутствует у всех трех патогенных для человека видов иерсиний. Однако у *Y. pestis* ген *yadA* из-за делеции одной пары оснований, вызывающей сдвиг рамки считывания, является псевдогеном [24, 25]. YadA – важный фактор патогенности *Y. enterocolitica*, и его делеция приводит к аттенуации штаммов на мышинной модели инфекции [26]. Мутантные штаммы с делецией гена *yadA* проникают через слизистую оболочку кишечника мышей, но не способны персистировать более 2 дней в их организме [27]. Напротив, белок YadA не является необходимым для вирулентности штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Введение функциональной копии гена *yadA* в геном штаммов *Y. pestis* вызывает умеренное снижение вирулентности [24]. Ген *yadA* расположен на плазмиде кальцийзависимости pCad (pYV) иерсиний, синтез белка индуцируется при повышении температуры до 37°C [28]. Экспрессия гена *yadA* регулируется температурочувствительным геном *lcrF* [29]. Установлено, что у *Y. pestis* и *E. coli* ген *lcrF* транскрибируется при температурах 26°C и 37°C на сопоставимых уровнях, но трансляция кодируемого белка эффективна только при 37°C [30]. У штаммов *Y. enterocolitica* обнаружили белок VirF, гомологичный LcrF чумного микроба, который также является активатором кодируемых плазмидой pCad генов, в том числе и *yadA*, продукты которых связаны с вирулентностью [31]. Недавнее исследование показало, что экспрессия *yadA* также модулируется регулятором транскрипции OmpR, который репрессирует ген путем непосредственного связывания с его промотором. OmpR-опосредованный контроль экспрессии *yadA* не зависит от механизма терморегуляции, упомянутого выше [32].

Размер белка YadA отличается у разных штаммов и может составлять от 422 до 455 аминокислотных остатков [33]. YadA является многофункциональным белком, который связывается с компонентами внеклеточного матрикса млекопитающих, такими как фибриллярные коллагены типов I, II, III [12, 26, 34], сетепобразующий коллаген типа IV, фибронектин и ламинин. Показано, что для связывания белку YadA необходима тройная спиральная конформация коллагена [35].

YadA обеспечивает адгезию к различным типам клеток, в том числе эпителиальным клеткам, нейтрофилам и макрофагам [36]. Для развития инфекционного процесса иерсинии

должны вступить в плотный контакт с клетками хозяина, который опосредуется путем взаимодействия инвазина InvA и белка YadA с β 1-интегрином. Предполагается, что в случае YadA это происходит путем связывания внеклеточного матрикса [37]. Затем в клетку хозяина вводятся эффекторный белки системы секреции III типа (*Yersinia* outer proteins – Yops), разрушающие ее цитоскелет и предотвращающие фагоцитоз [38, 39]. Размер YadA строго соответствует длине молекулярной иглы системы секреции III типа, и изменение длины одного из них без одновременной изменения длины другого предотвращает проникновение эффекторных белков в клетки хозяина [40]. Белок YadA участвует в автоагрегации бактериальных клеток [41], обеспечивает устойчивость к бактерицидной активности сыворотки, позволяя иерсиниям избегать системы комплемента хозяина, которая является первой линией защиты от микроорганизмов.

Триммерными автотранспортерами, присутствующими у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, являются белки YadB и YadC, которые имеют структуру, сходную с YadA [42]. Оба белка характеризуются слабой экспрессией у чумного микроба [42] и, в отличие от YadA, не играют роли в прикреплении к эпителиальным клеткам. Удаление локуса *yadBC* приводит к незначительному снижению способности к инвазии эпителиальных клеток (60% по сравнению со штаммом дикого типа) [42]. Кроме того, белки YadB и YadC на 60% увеличивают поглощение бактерий фагоцитами, подтверждая их роль в инвазии [43]. YadBC, по-видимому, не участвуют в патогенезе легочной чумы, и их роль при бубонной чуме окончательно не определена [44]. Однако гены *yadBC* чумного микроба характеризуются высоким уровнем экспрессии в организме блох [23], хотя и не играют значительной роли в их колонизации [43]. Тем не менее отсутствие этих генов приводит к двух-четырёхкратному снижению жизнеспособности клеток при внутрикожном пути введения *Y. pestis*, что указывает на их участие в выживании бактерии на начальных стадиях инфекции [43]. Кроме того, эти белки снижают уровень хемоаттрактанта CXCL-1, который продуцируется макрофагами, нейтрофилами и эпителиальными клетками и способствует миграции полиморфно-ядерных лейкоцитов [43].

Автотранспортеры типа Ve. Инвазин InvA, в дополнение к YadA, является основным адгезином энтеропатогенных иерсиний. InvA важен для развития первой фазы инфекционного процесса, позволяя бактериальным клеткам прикрепляться и проникать в M-клетки лимфатических фолликулов кишечника. Адгезия и интернализация энтеропатогенных иерсиний в пейеровых бляшках опосредуется InvA за счет связывания с β 1-интегрином, расположенным на апикальной поверхности M-клеток [45]. Этот процесс приводит к перестройкам цитоскелета клетки, где образуются очаговые комплексы адгезии. Затем следует интернализация бактерии и запуск выработки различных цитокинов [46]. Хотя InvA играет значительную роль в связывании и проникновении в клетки [47], его функции могут быть опосредованы белком YadA, хотя процесс будет проходить более медленно [48]. Размер белка InvA у *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* составляет 92 и 103 кДа соответственно.

Регуляция экспрессии белка зависит от различных факторов, среди которых главную роль играют температура и ре-

гулятор транскрипции RovA [49]. У *Y. pseudotuberculosis* синтез инвазина максимально выражен при температуре окружающей среды (25°C), тогда как при 37°C обнаруживаются только небольшие количества белка [4]. Недавно было показано, что экспрессия *invA* повышается во время персистирующей инфекции [50]. Экспрессия гена *invA* также может отличаться у разных штаммов. В частности, продукция InvA ингибируется при температуре 37°C у штаммов *Y. enterocolitica* серотипа O:8 из-за быстрой деградации термочувствительного белка RovA и подавления транскрипции гена *invA* с помощью гистоноподобного белка, структурирующего нуклеоиды [51, 52]. Аналогично, количество синтезируемого белка InvA снижается при температуре 37°C у *Y. enterocolitica* серотипа O:9 [53]. Напротив, InvA эффективно продуцируется штаммом *Y. enterocolitica* O:3 даже при температуре 37°C. Из-за единственной аминокислотной замены пролина на серин (P98S) у штаммов данного серотипа RovA слабо зависит от температуры [54]. Кроме того, вставка элемента IS1667 в промотор *invA* у *Y. enterocolitica* O:3 приводит к конститутивному образованию InvA [54]. Также было доказано, что инвазин *Y. pestis* не продуцируется из-за вставки IS200 в ген *invA* [27].

Установлено, что иерсинии обладают еще несколькими инвазин-подобными АТ, которые также участвуют в адгезии к клеткам хозяина и способствуют колонизации различных тканей млекопитающих. У *Y. pseudotuberculosis* обнаружили три дополнительных автотранспортера: белок семейства интимина (Ilr или InvB), InvC и InvD [55]. Ортолог InvC у *Y. pestis* упоминается как Ilr [56]. Эти белки имеют структурную организацию, сходную с InvA. Белок Ilr присутствует во всех штаммах *Y. pseudotuberculosis* [57]. Интересно, что у всех штаммов *Y. pestis* нуклеотидная последовательность гена *ilr* (intimin/InvA-like protein) нарушена вставкой IS285, за исключением штамма 91001, где он изменен вследствие точечной мутации. Белки Ilr и InvC иерсиний участвуют в адгезии к эпителиальным клеткам человека, мыши и свиньи и опосредуют инвазию [55, 57]. У *Y. pestis* делеция гена *ilr* приводит к снижению адгезии и интернализации штамма к клеткам HEp-2. Кроме того, у мышей, зараженных делеционным *ilr*-мутантом, наблюдали значительное удлинение сроков средней продолжительности жизни и снижение колонизации бактериями печени, почек и легких [57].

Белки с β-цилиндрической (бочкообразной) структурой

Адгезин Ail. Адгезин Ail (Attachment invasion locus) патогенных иерсиний, *Salmonella enterica* и *E. coli* принадлежит к Ail/Lom-семейству белков наружной мембраны [58]. Этот небольшой белок (17,6 кДа), синтез которого кодируется хромосомой, является важным фактором патогенности иерсиний. Многие из его функций, включая резистентность к сыворотке, участие в клеточной адгезии, инвазии и в доставке белков Yop в клетки хозяина, хорошо охарактеризованы [59–61].

У всех трех патогенных для человека иерсиний белок Ail играет важную роль в устойчивости к сыворотке. Причем делеция гена *ail* приводит штаммы *Y. pestis* к почти полной чувствительности к сыворотке крови человека и морской свинки [62, 63]. Однако из-за небольшого размера белка Ail

его активность обычно маскируется О-полисахаридной цепью и олигосахаридом кора липополисахарида (ЛПС) у *Y. enterocolitica* O:3 [64] или О-полисахаридом у *Y. pseudotuberculosis* YPIII [65]. Таким образом, белок Ail проявляет полную биологическую активность только у возбудителя чумы, обладающего R-формой ЛПС (rough – шероховатый), лишенной О-полисахаридной цепи.

У *Y. enterocolitica* и *Y. pestis* Ail опосредует связывание с различными эпителиальными клеточными линиями и белками внеклеточного матрикса [4, 60, 63, 66–68]. По некоторым данным, белок Ail *Y. pseudotuberculosis* не участвует в адгезии и инвазии [65, 69]. Интересно, что аминокислотная последовательность Ail *Y. pestis* практически идентична последовательности у *Y. pseudotuberculosis*, отличаясь только в двух положениях, что позволяет предположить, что эти аминокислотные остатки могут играть важную роль в связывании с компонентами клеток [65]. Кроме того, у *Y. pestis* Ail участвует в аутоагрегации [63].

Экспрессия гена *ail* у *Y. enterocolitica* более выражена при температуре 37°C и пониженном уровне кислорода, чем при более низких температурах [70, 71]. Напротив, у *Y. pestis* данный ген также экспрессируется при температуре 26°C, хотя и на более низких уровнях, чем при 37°C, что, вероятно, отражает адаптацию чумного микроба к другим путям заражения [62, 63]. Кроме того, уровни экспрессии *ail* намного выше у *Y. pestis*, чем у *Y. pseudotuberculosis* [62, 72]. *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* содержат три дополнительных паралога *ail*, гены *y1682*, *y2304* и *y2446*, но их продукты не участвуют в формировании устойчивости к сыворотке [62].

Активатор плазминогена. Активатор плазминогена (Pla), входящий в семейство омпинов [73], обладает протеолитической и адгезивной активностью, которые критически важны для прогрессирования бубонной и легочной чумы [74]. Синтез белка Pla кодируется геном, расположенным на плазмиде пестициногенности pPst (также называемой pPCP1 или pPla), которая есть в геноме только у *Y. pestis* [75]. Данная плазида входила в состав генома чумного микроба с давних времен, т.к. ген *pla* обнаружили в древних образцах ДНК из остатков людей бронзового века [1].

Основной функцией активатора плазминогена Pla является расщепление плазминогена с образованием его активной формы – пламина [76, 77]. Пламин – сериновая протеаза, расщепляющая фибриновые сгустки, деградация которых увеличивает скорость распространения чумного микроба в тканях хозяина, а также ингибирует образование иммунных клеток [77]. Кроме того, пламин расщепляет компоненты внеклеточного матрикса, такие как ламинин и фибронектин, и активирует матриксную металлопротеиназу, которая также способствует более быстрому распространению бактерий [77]. Было показано, что Pla способствует миграции бактерий от первичного очага инфекции к лимфатическим узлам при бубонной чуме; во время легочной чумы он необходим для размножения бактерий в дыхательных путях [77, 78]. Активатор плазминогена опосредует адгезию и инвазию макрофагов через рецептор DEC-205, что приводит к распространению *Y. pestis* на мышинной модели инфекции [79, 80]. Другие исследователи, напротив, сообщают, что Pla не способствует миграции бактерий в лимфатические узлы и не вызывает прямого повреждения органов, но обеспечива-

ет размножение чумного микроба и помогает защитить клетки *Y. pestis* от иммунной системы хозяина [81].

Недавние исследования показали защитную роль Fas-лиганда (FasL), деградируемого активатором плазминогена *Y. pestis*, в индукции иммунитета хозяина во время легочной формы инфекций [82]. FasL – это мембранный белок, необходимый для гибели клеток млекопитающих, и он действует как защитная молекула во время бактериальной пневмонии. У мышей, зараженных «диким» штаммом *Y. pestis*, наблюдалось снижение уровня FasL, в отличие от Δ *pla* мутантов. Последнее свидетельствует о том, что деградация FasL изменяет воспалительные реакции хозяина и способствует мультпликации *Y. pestis* в легких [82]. Активатор плазминогена Pla также инактивирует C3 фактора системы комплемента, что приводит к ингибированию опсоно-фагоцитоза [77].

Pla также является адгезином, который способствует инвазии клеток и доставке белков Yop, причем самый сильный эффект продемонстрирован при 37°C и 28°C при нейтральном pH [83, 84]. Pla присутствует при обеих температурах, но при 37°C его количество увеличивается в два раза, активность белка также увеличивается при этой температуре [73, 85, 86]. Pla опосредует прикрепление (и даже приводит к инвазии) эукариотических клеток и связывает компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген типа IV, ламинин и гепарансульфат протеогликан [87–89]. Кроме того, наличие R-формы ЛПС является критическим для протеолитической и адгезивной активности плазминогена [86, 90].

Фимбриальные адгезины

Белки с шаперон/ашерной системой секреции.

Фимбрии и пили – длинные линейные отростки, выступающие от поверхности клетки, сформированные из множества субъединиц. Эти структуры опосредуют адгезию и образование биопленки, участвуют в поглощении ДНК естественно компетентными бактериями, обеспечивают некоторые формы подвижности и конъюгацию. Многие фимбриальные структуры, особенно участвующие в адгезии, собираются по шаперон/ашерному пути секреции (Ш-А) [91]. *Y. pestis* продуцирует два всесторонне охарактеризованные адгезина: рН6 антиген (Psa) и капсульный антиген, или фракция 1 (F1 или Caf1) [80, 92], образующие на клеточной поверхности тонкие нити или капсулоподобную структуру соответственно.

Синтез капсульного антигена Caf1 *Y. pestis* кодируется видоспецифичной плазмидой pFca (также называемой pMT1 или pYT). Несмотря на то, что капсульный антиген не является классическим адгезином, это важный фактор патогенности, который помогает клетке чумного микроба противостоять фагоцитозу и уклоняться от системы врожденного иммунитета путем связывания с провоспалительным цитокином интерлейкином 1 β на ранних стадиях инфекции [93, 94]. Белок Caf1 экспрессируется при температуре тела млекопитающего; однако он может также играть роль в передаче возбудителя чумы через укусы блох [95].

В отличие от Caf1, Psa кодируется локусом *psaEFABC* хромосомной локализации, а ортологичные локусы обнаружили как у *Y. pseudotuberculosis*, так и у *Y. enterocolitica* [69, 96]. В последнем случае Psa упоминается как мукоидный фактор Muf. Все субъединицы пилина Psa обладают адге-

зивной активностью, благодаря чему белок является поливалентным адгезином [94].

У *Y. pestis* Psa является важным адгезином, опосредующим прикрепление к клеткам хозяина через β 1-связанные галактозилные остатки в гликофинголипидах [97], и может способствовать доставке эффекторных белков Yop [84, 98]. Вторым рецептором для Psa является фосфатидилхолин эпителиальных клеток альвеол [99]. Кроме того, Psa связывается с липопротеином низкой плотности, взаимодействуя с липидным компонентом мембран [100]. Пилин PsaA *Y. pestis* содержит различные, но смежно расположенные сайты связывания для галактозы и холина [101]. У Muf *Y. enterocolitica* нарушен холин-связывающий мотив, что объясняет отсутствие у данного белка способности агглютинировать эритроциты. Установлено, что опосредованная Psa *Y. pestis* гемагглютинация зависит от связывания фосфохолина [101]. Psa также помогает уклоняться от действия иммунной системы хозяина, возможно, за счет связывания с углеводной частью Fc-фрагмента IgG [102, 103]. Кроме того, Psa способствует образованию биопленки [104]. Известно, что синтез рН6-антигена экспрессируется при низком pH (<6) и температуре 37°C [105], хотя более поздние данные указывают на то, что белок может синтезироваться при температуре 28°C [102]. Синтез рН6-антигена более выражен у штаммов *Y. pestis*, чем у *Y. pseudotuberculosis* [106]. *Y. pestis* совместно экспрессирует *psa* и *caf*, причем в фенотипе штамма доминируют адгезивные свойства первого из них [106]. Интересно, что Psa и Caf1, по-видимому, ингибируют инвазию эпителиальных клеток *Y. pestis* [107].

После окончания проектов по полногеномному секвенированию штаммов чумного микроба обнаружили восемь дополнительных хромосомных локусов, кодирующих предполагаемые белки с шаперон/ашерными системами секреции. Однако у двух из них нарушены гены, кодирующие синтез ашеров, и поэтому они вряд ли являются функциональными [108]. Все шесть интактных локусов при гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* продуцировали пилеподобные структуры, хотя продукт только одного из них, *y0561–0563*, участвовал в адгезии к эпителиальным клеткам и способствовал формированию биопленки при температуре 28°C [104]. Однако делеция этого локуса в штамме *Y. pestis* не оказала заметного влияния на адгезию. Удаление другого локуса, *y1858–1862*, привело к незначительному снижению вирулентности штамма *Y. pestis* при внутривенном заражении мышей и вызвало уменьшение адгезии к макрофагальной клеточной линии, что позволяет предположить, что эта фимбрия может играть роль в уклонении от иммунного ответа хозяина [104]. Более позднее исследование показало, что делеции локусов *y0348–0352* и *y1869–1873* оказывали сходные эффекты на модели интраназальной инфекции у мышей [108].

Пили IV типа. Другим классом фимбриальных адгезинов являются пили IV типа, которые представляют собой выдвигающиеся поверхностные придатки, которые придают подвижность некоторым видам бактерий [109]. В отличие от шаперон/ашерных систем, пили IV типа собираются из белкового комплекса, охватывающего как внутреннюю, так и внешнюю мембраны, подобно системам секреции II типа [110]. Существует несколько генетических локусов, кодиру-

ющих синтез пилей IV типа. Установлено, что локус *pil* расположен на «острове патогенности» YAPI у *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, но отсутствует у *Y. pestis* [111]. Многие штаммы *Y. pseudotuberculosis* обладают локусом *pil*, продукты которого при гетерологичной экспрессии в *E. coli* образуют полярно расположенные пучки пилей [112]. Экспрессия *pil* усиливается в условиях повышения температуры и осмолярности, а удаление локуса *pil* приводит к снижению вирулентности штаммов энтерона мышинной модели [112].

Вторым локусом пилей IV типа является *tad* (Tight Adhesion), кодирующий фимбриальный белок с низким молекулярным весом (Flp) [113]. Локус широко распространен у грамотрицательных бактерий и присутствует у всех патогенных иерсиний [114]. Однако у *Y. pestis* он, скорее всего, неактивен из-за делеции основного гена пилина *flp* и мутации со сдвигом рамки считывания в другом гене, кодирующем предполагаемый секретин [115]. У *Y. enterocolitica* пили Flp обнаруживаются только у части клеточной популяции, но, по-видимому, они участвуют в формировании микроколоний при температуре 26°C [114].

Другие адгезины

Поливалентная молекула адгезии 7 (Multivalent Adhesion Molecule 7 – MAM7), конститутивно экспрессирующийся белок наружной мембраны *Vibrio parahaemolyticus*, состоит из семи повторяющихся доменов и широко распространен у других грамотрицательных бактерий. Установлено, что MAM7 *V. parahaemolyticus*, опосредующий прикрепление к клеткам хозяина, связывается с фибронектином и фосфатидовой кислотой, обладая значительно более высокой аффинностью к последней [116, 117]. Ортологичный ген обнаружили у всех трех патогенных видов иерсиний. Установлено, что белок MAM7 играет роль в вирулентности штаммов *Y. pseudotuberculosis*, т.к. делеционный мутант обладал сниженной способностью к прикреплению к фибробластам и цитотоксичностью, чем штамм дикого типа, а также комплементированный мутантный штамм. Кроме того, при экспрессии белка в клетках *E. coli*, последняя была способна к адгезии к клеткам HeLa и конкурировала с *Y. pseudotuberculosis* за эффективность связывания [117].

Важным этапом жизненного цикла чумного микроба является колонизация преджелудка блохи с образованием окклюзионной биопленки [118]. Этот процесс зависит от продуктов локуса аккумуляции гемина (от англ. hemin storage), оперона *hmsHFRS*, которые активны при температуре 26°C, но не при 37°C [119]. Оперон кодирует синтез и экспорт внеклеточного полисахарида поли-β-1,6-N-ацетил-D-глюкозамина, который образует матрицу биопленки [59]. Способность к образованию биопленки усилена у чумного микроба по сравнению с возбудителем псевдотуберкулеза из-за сдвига рамки считывания, обусловленного внутренним дублированием в гене-репрессоре *rscA* [120].

Кроме того, липополисахарид может действовать как адгезин. Установлено, что олигосахарид кора ЛПС *Y. pestis* взаимодействует с экспрессируемым антиген-презентирующими клетками лектиновым рецептором DC-SIGN (специфичная для дендритных клеток молекула межклеточной адгезии, захватывающая неинтегрин – Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), из-

вестным еще как CD209 [121]. Это взаимодействие позволяет *Y. pestis* проникать в антиген-презентирующие клетки (дендритные клетки и макрофаги), которые чумной микроб использует для распространения из первичного очага инфекции в лимфатические узлы.

Заключение

Клеточная оболочка грамотрицательных бактерий является одним из основных барьеров при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными патогенами [122–124]. Проницаемость наружной мембраны иерсиний в основном определяют липополисахарид, а также обилие и репертуар общих и специфических поринов с β-бочкообразной структурой, обеспечивающих активный транспорт или диффузию субстратов [125, 126]. Кроме того, наружная мембрана содержит многочисленные белки, которые тесно связаны с патогенностью. Учитывая существующие трудности проведения антибиотикотерапии инфекций, вызванных грамотрицательными патогенами, и появление все большего числа штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, вмешательство в биогенез белков наружной мембраны может быть привлекательной стратегией. Благодаря данному целенаправленному вмешательству грамотрицательные бактерии, возможно, станут более доступны для антибиотиков, и в то же время их патогенность может быть снижена. Однако для этого необходимо иметь точное представление о механизмах биогенеза белков наружной мембраны, а также понимать роль данных факторов патогенности в сложном взаимодействии с хозяином во время инфекции.

Иерсинии представляют собой важный с медицинской точки зрения, повсеместно распространенный и интересный с биологической точки зрения род бактерий. Они широко используются в качестве модельных микроорганизмов для изучения внеклеточной инфекции, доставки эффекторов системы секреции типа III, уклонения от иммунной системы хозяина и адгезии. В течение долгого времени основными адгезинами энтеропатогенных иерсиний считались белки YadA, InvA и, в меньшей степени, Ail. Несмотря на их явно лидирующие позиции в процессе адгезии в последние годы для данных микроорганизмов установили роль в патогенности иерсиний других типов адгезинов: автотранспортеров, фимбрий и т.д. Возбудитель чумы, не продуцирующий ни YadA, ни InvA, содержит альтернативные адгезины, например Psa, и другие белки с потенциально адгезивными свойствами, обнаруженные при проведении проектов по полногеномному секвенированию.

Примечательной особенностью вирулентного фенотипа штаммов *Y. enterocolitica* является доминирование YadA. У большинства других бактериальных патогенов, включая *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, ни один из адгезинов не оказывает столь глубокого влияния не только на адгезивные свойства бактерий, но и на устойчивость к сыворотке крови и фагоцитозу. Во многих случаях эффекты одного адгезина трудно установить из-за функциональной избыточности молекул адгезии, как это было показано на примере сальмонелл, для которых описано множество адгезинов, ни один из которых не имеет главного значения для патогенности [127]. Роль белка YadA *Y. enterocolitica*, таким образом, совершенно исключительна.

Основным регулятором вирулентности штаммов иерсиний является температура. При различных температурах поверхностно расположенные молекулы иерсиний различны. Это относится не только к набору экспрессируемых адгезинов, но и к другим поверхностным молекулам, таким как системы секреции Ysa и Ysc типа III, жгутики и ЛПС [128–132]. Хотя некоторые белки, по-видимому, доминируют в адгезивном фенотипе при определенных температурах (в частности, InvA при температуре окружающей среды и YadA при температуре тела млекопитающих у энтеропатогенных иерсиний), несколько адгезинов экспрессируются одновременно при любой заданной температуре, и даже, по-видимому, существует некоторое перекрытие между дифференцированно экспрессируемыми адгезинами. Однако лишь в нескольких исследованиях рассматривалось взаимодействие адгезинов в функциях адгезии и иммунного уклонения [64, 107, 133–137]. Хотя эти исследования и более сложны, они необходимы для полного определения роли адгезинов *in vivo*, остающейся неизвестной несмотря на большое количество экспериментальных данных по отдельным адгезинам. Кроме того, различные адгезины могут играть разную роль в организме разных хозяев, о чем свидетельствует важность белка InvA при инфицировании свиней, являющихся значимым резервуаром для *Y. enterocolitica* O:3 [138]. Таким образом, чтобы получить полное представление о функциях отдельных адгезинов или адгезинов, действующих согласованно, недостаточно изучить только один вид хозяина. *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* способны заражать не только различных млекопитающих, но и насекомых и нематод, а также могут быть найдены свободно живущими в окружающей среде [129, 139–141]. Для *Y. pestis* колонизация блох является важной стадией инфекционного цикла, и изучение этого взаимодействия дало много данных о факторах, необходимых для выживания чумного микроба в их организме, формирования биопленок и передачи патогена новым хозяевам – млекопитающим [142].

В последнее время появились данные, что даже близкородственные адгезины у разных штаммов могут иметь существенно разные функции [65, 143, 144]. Таким образом, не все результаты, полученные для одного адгезина, могут быть применимы к участию в адгезии его ортологов у других штаммов, не говоря уже об ортологах других видов иерсиний. Поэтому при исследованиях было бы интересно провести подобное сравнение для оценки общности полученных результатов. Особенно плодотворным может оказаться сравнение адгезинов «классических» патогенных иерсиний с адгезинами видов, не являющимися патогенными для человека или млекопитающих, такими как *Y. ruckeri* (возбудитель заболевания рыб) и *Y. entomophaga* (возбудитель инфекции у насекомых). Это потенциально может пролить свет на патогенез инфекций, вызываемых обеими группами микроорганизмов и дать представление о механизмах вирулентности штаммов для разных хозяев.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was performed of the program Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Rasmussen S, Allentoft ME, Nielsen K, Orlando L, Sikora M, Sjögren KG, et al. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):571-82. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.009
- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17837-42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
- Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jan;10(1):35-66. DOI: 10.1128/CMR.10.1.35-66.1997
- Isberg RR, Swain A, Falkow S. Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* *inv* gene with hybrid proteins. *Infect Immun*. 1988 Aug;56(8):2133-8. DOI: 10.1128/IAI.56.8.2133-2138.1988
- Kapperud G, Namork E, Skurnik M, Nesbakken T. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun*. 1987 Sep;55(9):2247-54. DOI: 10.1128/IAI.55.9.2247-2254.1987
- Skurnik M. Lack of correlation between the presence of plasmids and fimbriae in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Appl Bacteriol*. 1984 Jun;56(3):355-63. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1984.tb01362.x
- Chauhan N, Wrobel A, Skurnik M, Leo JC. *Yersinia* adhesins: An arsenal for infection. *Proteomics Clin Appl*. 2016 Oct;10(9-10):949-963. DOI: 10.1002/prca.201600012
- Linke D, Riess T, Autenrieth IB, Lupas A, Kempf VA. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol*. 2006 Jun;14(6):264-70. DOI: 10.1016/j.tim.2006.04.005
- Leo JC, Oberhettinger P, Schütz M, Linke D. The inverse autotransporter family: intimin, invasins and related proteins. *Int J Med Microbiol*. 2015 Feb;305(2):276-82. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.12.011
- Lenz JD, Lawrenz MB, Cotter DG, Lane MC, Gonzalez RJ, Palacios M, Miller VL. Expression during host infection and localization of *Yersinia pestis* autotransporter proteins. *J Bacteriol*. 2011 Nov;193(21):5936-49. DOI: 10.1128/JB.05877-11
- Yen YT, Karkal A, Bhattacharya M, Fernandez RC, Stathopoulos C. Identification and characterization of autotransporter proteins of *Yersinia pestis* KIM. *Mol Membr Biol*. 2007 Jan-Feb;24(1):28-40. DOI: 10.1080/09687860600927626
- Flügel A, Schulze-Koops H, Heesemann J, Kühn K, Sorokin L, Burkhardt H, von der Mark K, Emmrich F. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem*. 1994 Nov 25;269(47):29732-8
- Lawrenz MB, Pennington J, Miller VL. Acquisition of omptin reveals cryptic virulence function of autotransporter YapE in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol*. 2013 Jul;89(2):276-87. DOI: 10.1111/mmi.12273
- Lawrenz MB, Lenz JD, Miller VL. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect Immun*. 2009 Jan;77(1):317-26. DOI: 10.1128/IAI.01206-08
- Lane MC, Lenz JD, Miller VL. Proteolytic processing of the *Yersinia pestis* YapG autotransporter by the omptin protease Pla and the contribution of YapG to murine plague pathogenesis. *J Med Microbiol*. 2013 Aug;62(Pt 8):1124-1134. DOI: 10.1099/jmm.0.056275-0
- Besingi RN, Chaney JL, Clark PL. An alternative outer membrane secretion mechanism for an autotransporter protein lacking a C-terminal stable core. *Mol Microbiol*. 2013 Dec;90(5):1028-45. DOI: 10.1111/mmi.12414

17. Nair MK, De Masi L, Yue M, Galván EM, Chen H, Wang F, Schifferli DM. Adhesive properties of YapV and paralogous autotransporter proteins of *Yersinia pestis*. *Infect Immun*. 2015 May;83(5):1809-19. DOI: 10.1128/IAI.00094-15
18. Felek S, Lawrenz MB, Krukoni ES. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. *Microbiology (Reading)*. 2008 Jun;154(Pt 6):1802-1812. DOI: 10.1099/mic.0.2007/010918-0
19. Lenz JD, Temple BR, Miller VL. Evolution and virulence contributions of the autotransporter proteins YapJ and YapK of *Yersinia pestis* C092 and their homologs in *Y. pseudotuberculosis* IP32953. *Infect Immun*. 2012 Oct;80(10):3693-705. DOI: 10.1128/IAI.00529-12
20. Andrews GP, Vernati G, Ulrich R, Rocke TE, Edwards WH, Adamovicz JJ. Identification of *in vivo*-induced conserved sequences from *Yersinia pestis* during experimental plague infection in the rabbit. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010 Oct;10(8):749-56. DOI: 10.1089/vbz.2009.0179
21. Flashner Y, Mamroud E, Tidhar A, Ber R, Aftalion M, Gur D, et al. Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. *Infect Immun*. 2004 Feb;72(2):908-15. DOI: 10.1128/iai.72.2.908-915.2004
22. Li B, Zhou L, Guo J, Wang X, Ni B, Ke Y, Zhu Z, Guo Z, Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay. *Infect Immun*. 2009 Oct;77(10):4356-61. DOI: 10.1128/IAI.00242-09
23. Vadyvaloo V, Jarrett C, Sturdevant DE, Sebbane F, Hinnebusch BJ. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. *PLoS Pathog*. 2010 Feb 26;6(2):e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783
24. Rosqvist R, Skurnik M, Wolf-Watz H. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature*. 1988 Aug 11;334(6182):522-4. DOI: 10.1038/334522a0
25. Skurnik M, Wolf-Watz H. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol*. 1989 Apr;3(4):517-29. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00198.x
26. Terti R, Skurnik M, Vartio T, Kuusela P. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun*. 1992 Jul;60(7):3021-4. DOI: 10.1128/IAI.60.7.3021-3024.1992
27. Simonet M, Riot B, Fortineau N, Berche P. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun*. 1996 Jan;64(1):375-9. DOI: 10.1128/IAI.64.1.375-379.1996
28. Bölin I, Norlander L, Wolf-Watz H. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun*. 1982 Aug;37(2):506-12. DOI: 10.1128/IAI.37.2.506-512.1982
29. Skurnik M, Toivanen P. LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol*. 1992 Mar;174(6):2047-51. DOI: 10.1128/jb.174.6.2047-2051.1992
30. Hoe NP, Goguen JD. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol*. 1993 Dec;175(24):7901-9. DOI: 10.1128/jb.175.24.7901-7909.1993
31. Michiels T, Vanooteeghem JC, Lambert de Rouvroit C, China B, Gustin A, et al. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*. 1991 Aug;173(16):4994-5009. doi: 10.1128/jb.173.16.4994-5009.1991
32. Nieckarz M, Raczkowska A, Dębski J, Kistowski M, Dadlez H, Heesemann J, Rossier O, Brzostek K. Impact of *OmpR* on the membrane proteome of *Yersinia enterocolitica* in different environments: repression of major adhesin YadA and heme receptor HemR. *Environ Microbiol*. 2016 Mar;18(3):997-1021. DOI: 10.1111/1462-2920.13165
33. Hoiczyc E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J*. 2000 Nov 15;19(22):5989-99. DOI: 10.1093/emboj/19.22.5989
34. Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H, Heesemann J. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol*. 2003 Jul;185(13):3735-44. DOI: 10.1128/jb.185.13.3735-3744.2003
35. Leo JC, Elovaara H, Brodsky B, Skurnik M, Goldman A. The *Yersinia* adhesin YadA binds to a collagenous triple-helical conformation but without sequence specificity. *Protein Eng Des Sel*. 2008 Aug;21(8):475-84. DOI: 10.1093/protein/gzn025
36. Eisen RJ, Petersen JM, Higgins CL, Wong D, Levy CE, Mead PS, Schriefer ME, Griffith KS, Gage KL, Beard CB. Persistence of *Yersinia pestis* in soil under natural conditions. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jun;14(6):941-3. DOI: 10.3201/eid1406.080029
37. Eitel J, Dersch P. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasion is repressed. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):4880-91. DOI: 10.1128/iai.70.9.4880-4891.2002
38. Matsumoto H, Young GM. Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Feb;12(1):94-100. DOI: 10.1016/j.mib.2008.12.005
39. Plano GV, Schesser K. The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol Res*. 2013 Dec;57(1-3):237-45. DOI: 10.1007/s12026-013-8454-3
40. Mota LJ, Journet L, Sorg I, Agrain C, Cornelis GR. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science*. 2005 Feb 25;307(5713):1278. DOI: 10.1126/science.1107679
41. Balligand G, Laroche Y, Cornelis G. Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun*. 1985 Jun;48(3):782-6. DOI: 10.1128/IAI.48.3.782-786.1985
42. Forman S, Wulff CR, Myers-Morales T, Cowan C, Perry RD, Straley SC. *yadBC* of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infect Immun*. 2008 Feb;76(2):578-87. DOI: 10.1128/IAI.00219-07
43. Uittenbogaard AM, Myers-Morales T, Gorman AA, Welsh E, Wulff C, Hinnebusch BJ, Korhonen TK, Straley SC. Temperature-dependence of *yadBC* phenotypes in *Yersinia pestis*. *Microbiology (Reading)*. 2014 Feb;160(Pt 2):396-405. DOI: 10.1099/mic.0.073205-0
44. Felek S, Krukoni ES. The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infect Immun*. 2009 Feb;77(2):825-36. DOI: 10.1128/IAI.00913-08
45. Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*. 1990 Mar 9;60(5):861-71. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90099-z
46. Palumbo RN, Wang C. Bacterial invasin: structure, function, and implication for targeted oral gene delivery. *Curr Drug Deliv*. 2006 Jan;3(1):47-53. DOI: 10.2174/156720106775197475
47. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun*. 1998 Mar;66(3):1237-43. DOI: 10.1128/IAI.66.3.1237-1243.1998
48. Yang Y, Isberg RR. Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* *yadA* product. *Infect Immun*. 1993 Sep;61(9):3907-13. DOI: 10.1128/IAI.61.9.3907-3913.1993
49. Nagel G, Lahrz A, Dersch P. Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of *RovA*, a transcriptional activator of the *SlyA/Hor* family. *Mol Microbiol*. 2001 Sep;41(6):1249-69. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02522.x
50. Avican K, Fahlgren A, Huss M, Heroven AK, Beckstette M, Dersch P, Fällman M. Reprogramming of *Yersinia* from virulent to persistent mode revealed by complex *in vivo* RNA-seq analysis. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 15;11(1):e1004600. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004600

51. PLOS Pathogens Staff. Correction: Reprogramming of *Yersinia* from virulent to persistent mode revealed by complex in vivo RNA-seq analysis. PLoS Pathog. 2015 Mar 25;11(3):e1004769. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004769. Erratum for: PLoS Pathog. 2015 Jan;11(1):e1004600
52. Quade N, Mendonca C, Herbst K, Heroven AK, Ritter C, Heinz DW, Dersch P. Structural basis for intrinsic thermosensing by the master virulence regulator RovA of *Yersinia*. J Biol Chem. 2012 Oct 19;287(43):35796-803. DOI: 10.1074/jbc.M112.379156
53. Trček J, Fuchs TM, Trülzsch K. Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasion expression in vitro and in vivo using a novel luxCDABE reporter system. Microbiology (Reading). 2010 Sep;156(Pt 9):2734-2745. DOI: 10.1099/mic.0.038240-0
54. Uliczka F, Pisano F, Schaake J, Stolz T, Rohde M, Fruth A, et al. Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. PLoS Pathog. 2011 Jul;7(7):e1002117. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002117
55. Pisano F, Kochut A, Uliczka F, Geyer R, Stolz T, Thiermann T, Rohde M, Dersch P. In vivo-induced InvA-like autotransporters Ifp and InvC of *Yersinia pseudotuberculosis* promote interactions with intestinal epithelial cells and contribute to virulence. Infect Immun. 2012 Mar;80(3):1050-64. DOI: 10.1128/IAI.05715-11
56. Seo KS, Kim JW, Park JY, Viall AK, Minnich SS, Rohde HN, et al. Role of a new intimin/invasin-like protein in *Yersinia pestis* virulence. Infect Immun. 2012 Oct;80(10):3559-69. DOI: 10.1128/IAI.00294-12
57. Strong PC, Hinchliffe SJ, Patrick H, Atkinson S, Champion OL, Wren BW. Identification and characterisation of a novel adhesin Ifp in *Yersinia pseudotuberculosis*. BMC Microbiol. 2011 Apr 28;11:85. DOI: 10.1186/1471-2180-11-85
58. Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Aug 6;2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103
59. Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. Environ Microbiol. 2008 Jun;10(6):1419-32. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01554.x
60. Miller VL, Falkow S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infect Immun. 1988 May;56(5):1242-8. DOI: 10.1128/IAI.56.5.1242-1248.1988
61. Pierson DE. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. J Bacteriol. 1994 Jul;176(13):4043-51. DOI: 10.1128/jb.176.13.4043-4051.1994
62. Bartra SS, Styer KL, O'Bryant DM, Nilles ML, Hinnebusch BJ, Aballay A, Plano GV. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. Infect Immun. 2008 Feb;76(2):612-22. DOI: 10.1128/IAI.01125-07
63. Kolodziejek AM, Sinclair DJ, Seo KS, Schnider DR, Deobald CF, Rohde HN, et al. Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM. Microbiology (Reading). 2007 Sep;153(Pt 9):2941-2951. DOI: 10.1099/mic.0.2006/005694-0
64. Biedzka-Sarek M, Salmenlinna S, Gruber M, Lupas AN, Meri S, Skurnik M. Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infect Immun. 2008 Nov;76(11):5016-27. DOI: 10.1128/IAI.00314-08
65. Tsang TM, Wiese JS, Felek S, Kronshage M, Krukoni ES. Ail proteins of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* have different cell binding and invasion activities. PLoS One. 2013 Dec 27;8(12):e83621. DOI: 10.1371/journal.pone.0083621
66. Bartra SS, Ding Y, Miya Fujimoto L, Ring JG, Jain V, Ram S, Marassi FM, Plano GV. *Yersinia pestis* uses the Ail outer membrane protein to recruit vitronectin. Microbiology (Reading). 2015 Nov;161(11):2174-2183. DOI: 10.1099/mic.0.000179
67. Tsang TM, Felek S, Krukoni ES. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. Infect Immun. 2010 Aug;78(8):3358-68. DOI: 10.1128/IAI.00238-10
68. Yamashita S, Lukacik P, Barnard TJ, Noinaj N, Felek S, Tsang TM, et al. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. Structure. 2011 Nov 9;19(11):1672-82. DOI: 10.1016/j.str.2011.08.010
69. Yang Y, Merriam JJ, Mueller JP, Isberg RR. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. Infect Immun. 1996 Jul;64(7):2483-9. DOI: 10.1128/IAI.64.7.2483-2489.1996
70. Bliska JB, Falkow S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 15;89(8):3561-5. DOI: 10.1073/pnas.89.8.3561
71. Pierson DE, Falkow S. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infect Immun. 1993 May;61(5):1846-52. DOI: 10.1128/IAI.61.5.1846-1852
72. Pieper R, Huang ST, Robinson JM, Clark DJ, Alami H, Parmar PP, Perry RD, Fleischmann RD, Peterson SN. Temperature and growth phase influence the outer-membrane proteome and the expression of a type VI secretion system in *Yersinia pestis*. Microbiology (Reading). 2009 Feb;155(Pt 2):498-512. DOI: 10.1099/mic.0.022160-0
73. Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Invited review: Breaking barriers – attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. Innate Immun. 2009 Apr;15(2):67-80. DOI: 10.1177/1753425909102559
74. Sebbane F, Jarrett CO, Gardner D, Long D, Hinnebusch BJ. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 4;103(14):5526-30. DOI: 10.1073/pnas.0509544103
75. Sodeinde OA, Goguen JD. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. Infect Immun. 1988 Oct;56(10):2743-8. DOI: 10.1128/IAI.56.10.2743-2748.1988
76. Kukkonen M, Lähteenmäki K, Suomalainen M, Kalkkinen N, Emödy L, Lång H, Korhonen TK. Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. Mol Microbiol. 2001 Jun;40(5):1097-111. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02451.x
77. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. Science. 1992 Nov 6;258(5084):1004-7. DOI: 10.1126/science.1439793
78. Lathem WW, Price PA, Miller VL, Goldman WE. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. Science. 2007 Jan 26;315(5811):509-13. DOI: 10.1126/science.1137195
79. Zhang SS, Park CG, Zhang P, Bartra SS, Plano GV, Klena JD, et al. Plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination. J Biol Chem. 2008 Nov 14;283(46):31511-21. DOI: 10.1074/jbc.M804646200
80. Lindler LE, Tall BD. *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. Mol Microbiol. 1993 Apr;8(2):311-24. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01575.x
81. Guinet F, Avé P, Filali S, Huon C, Savin C, Huerre M, Fiette L, Carniel E. Dissociation of Tissue Destruction and Bacterial Expansion during Bubonic Plague. PLoS Pathog. 2015 Oct 20;11(10):e1005222. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005222
82. Caulfield AJ, Walker ME, Gielda LM, Lathem WW. The Pla protease of *Yersinia pestis* degrades fas ligand to manipulate host cell death and inflammation. Cell Host Microbe. 2014 Apr 9;15(4):424-34. DOI: 10.1016/j.chom.2014.03.005
83. Cowan C, Jones HA, Kaya YH, Perry RD, Straley SC. Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasin. Infect Immun. 2000 Aug;68(8):4523-30. DOI: 10.1128/iai.68.8.4523-4530.2000

84. Felek S, Tsang TM, Krukons ES. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. *Infect Immun*. 2010 Oct;78(10):4134-50. DOI: 10.1128/IAI.00167-10
85. Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, Gonzales AD, Corzett CH, Chang BC, et al. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J Bacteriol*. 2005 Dec;187(23):8172-80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005
86. Suomalainen M, Lobo LA, Brandenburg K, Lindner B, Virkola R, Knirel YA, et al. Temperature-induced changes in the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* affect plasminogen activation by the *pla* surface protease. *Infect Immun*. 2010 Jun;78(6):2644-52. DOI: 10.1128/IAI.01329-09
87. Kienle Z, Emödy L, Svanborg C, O'Toole PW. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J Gen Microbiol*. 1992 Aug;138 Pt 8:1679-87. DOI: 10.1099/00221287-138-8-1679
88. Lähteenmäki K, Virkola R, Sarén A, Emödy L, Korhonen TK. Expression of plasminogen activator *pla* of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun*. 1998 Dec;66(12):5755-62. DOI: 10.1128/IAI.66.12.5755-5762.1998
89. Lähteenmäki K, Kukkonen M, Korhonen TK. The Pla surface protease/adhesin of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. *FEBS Lett*. 2001 Aug 24;504(1-2):69-72. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02775-2
90. Kukkonen M, Suomalainen M, Kyllönen P, Lähteenmäki K, Lång H, Virkola R, Helander IM, Holst O, Korhonen TK. Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2004 Jan;51(1):215-25. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03817.x
91. Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Apr 19;367(1592):1112-22. DOI: 10.1098/rstb.2011.0206
92. Galyov EE, Smirnov OYu, Karlishhev AV, Volkovoy KI, Denesyuk AI, Nazimov IV, et al. Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes. *FEBS Lett*. 1990 Dec 17;277(1-2):230-2. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80852-a
93. Du Y, Rosqvist R, Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun*. 2002 Mar;70(3):1453-60. DOI: 10.1128/iai.70.3.1453-1460.2002
94. Zavialov A, Zav'yalova G, Korpela T, Zav'yalov V. FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2007 Jul;31(4):478-514. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00075.x
95. Sebbane F, Jarrett C, Gardner D, Long D, Hinnebusch BJ. The *Yersinia pestis* caf1M1A1 fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):1222-9. DOI: 10.1128/IAI.00950-08
96. Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Diaz R, Knutton S, Cornelis GR. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*. 1993 Aug;9(3):507-20. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01712.x
97. Payne D, Tatham D, Williamson ED, Titball RW. The pH 6 antigen of *Yersinia pestis* binds to beta1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids. *Infect Immun*. 1998 Sep;66(9):4545-8.
98. Huang XZ, Lindler LE. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):7212-9. DOI: 10.1128/IAI.72.12.7212-7219.2004
99. Galván EM, Chen H, Schifferli DM. The Psa fimbriae of *Yersinia pestis* interact with phosphatidylcholine on alveolar epithelial cells and pulmonary surfactant. *Infect Immun*. 2007 Mar;75(3):1272-9. DOI: 10.1128/IAI.01153-06
100. Makoveichuk E, Cherepanov P, Lundberg S, Forsberg A, Olivecrona G. pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. *J Lipid Res*. 2003 Feb;44(2):320-30. DOI: 10.1194/jlr.M200182-JLR200
101. Bao R, Nair MK, Tang WK, Esser L, Sadhukhan A, Holland RL, Xia D, Schifferli DM. Structural basis for the specific recognition of dual receptors by the homopolymeric pH 6 antigen (Psa) fimbriae of *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 15;110(3):1065-70. DOI: 10.1073/pnas.1212431110
102. Zav'yalov V, Zavialov A, Zav'yalova G, Korpela T. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS Microbiol Rev*. 2010 May;34(3):317-78. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00201.x
103. Zav'yalov VP, Abramov VM, Cherepanov PG, Spirina GV, Chernovskaya TV, Vasiliev AM, Zav'yalova GA. pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996 May;14(1):53-7. DOI: 10.1111/j.1574-695X.1996.tb00267.x
104. Felek S, Jeong JJ, Runco LM, Murray S, Thanassi DG, Krukons ES. Contributions of chaperone/usher systems to cell binding, biofilm formation and *Yersinia pestis* virulence. *Microbiology (Reading)*. 2011 Mar;157(Pt 3):805-818. DOI: 10.1099/mic.0.044826-0
105. Price SB, Freeman MD, Yeh KS. Transcriptional analysis of the *Yersinia pestis* pH 6 antigen gene. *J Bacteriol*. 1995 Oct;177(20):5997-6000. DOI: 10.1128/jb.177.20.5997-6000.1995
106. Ansong C, Schrimpe-Rutledge AC, Mitchell HD, Chauhan S, Jones MB, Kim YM, et al. A multi-omic systems approach to elucidating *Yersinia* virulence mechanisms. *Mol Biosyst*. 2013 Jan 27;9(1):44-54. DOI: 10.1039/c2mb25287b
107. Liu F, Chen H, Galván EM, Lasaro MA, Schifferli DM. Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells. *Infect Immun*. 2006 Oct;74(10):5636-44. DOI: 10.1128/IAI.00612-06
108. Hatkoff M, Runco LM, Pujol C, Jayatilaka I, Furie MB, Bliska JB, Thanassi DG. Roles of chaperone/usher pathways of *Yersinia pestis* in a murine model of plague and adhesion to host cells. *Infect Immun*. 2012 Oct;80(10):3490-500. DOI: 10.1128/IAI.00434-12
109. Berry JL, Pelicic V. Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Jan;39(1):134-54. DOI: 10.1093/femsre/fuu001
110. Nivaskumar M, Francetic O. Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1843(8):1568-77. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.020
111. Colly F, Billault A, Mullet C, Simonet M, Marceau M. YAPI, a new *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity island. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4784-90. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4784-4790.2004
112. Colly F, Léty MA, Nair S, Escuyer V, Ben Younes A, Simonet M, Marceau M. *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):6196-205. DOI: 10.1128/iai.70.11.6196-6205.2002
113. Tomich M, Planet PJ, Figurski DH. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat Rev Microbiol*. 2007 May;5(5):363-75. DOI: 10.1038/nrmicro1636
114. Schilling J, Wagner K, Seekircher S, Greune L, Humberg V, Schmidt MA, Heussipp G. Transcriptional activation of the tad type IVb pilus operon by PypB in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*. 2010 Jul;192(14):3809-21. DOI: 10.1128/JB.01672-09
115. Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, Challis GL, et al. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet*. 2006 Dec 15;2(12):e206. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020206
116. Krachler AM, Orth K. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands. *J Biol Chem*. 2011 Nov 11;286(45):38939-47. DOI: 10.1074/jbc.M111.291377
117. Krachler AM, Ham H, Orth K. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 12;108(28):11614-9. DOI: 10.1073/pnas.1102360108

118. Hinnebusch BJ, Erickson DL. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. Bacterial biofilms. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008, p. 229-248.
119. Perry RD, Pendrak ML, Schuetz P. Identification and cloning of a hemin storage locus involved in the pigmentation phenotype of *Yersinia pestis*. J Bacteriol. 1990 Oct;172(10):5929-37. DOI: 10.1128/jb.172.10.5929-5937.1990
120. Sun YC, Hinnebusch BJ, Darby C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 10;105(23):8097-101. DOI: 10.1073/pnas.0803525105
121. Zhang P, Skurnik M, Zhang SS, Schwartz O, Kalyanasundaram R, Bulgheresi S, et al. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells. Infect Immun. 2008 May;76(5):2070-9. DOI: 10.1128/IAI.01246-07
122. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev. 1992 Sep;56(3):395-411
123. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Dec;67(4):593-656. DOI: 10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003
124. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta. 2009 May;1794(5):808-16. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
125. Delcour AH. Solute uptake through general porins. Front Biosci. 2003 May 1;8:d1055-71. DOI: 10.2741/1132
126. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. 2008 Dec;6(12):893-903. DOI: 10.1038/nrmicro1994
127. Wagner C, Hensel M. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. Adv Exp Med Biol. 2011;715:17-34. DOI: 10.1007/978-94-007-0940-9_2
128. De Rouvoit CL, Sluiter C, Cornelis GR. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol. 1992 Feb;6(3):395-409. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01483.x
129. Walker KA, Maltez VI, Hall JD, Vitko NP, Miller VL. A phenotype at last: essential role for the *Yersinia enterocolitica* Ysa type III secretion system in a *Drosophila melanogaster* S2 cell model. Infect Immun. 2013 Jul;81(7):2478-87. DOI: 10.1128/IAI.01454-12
130. Skurnik M, Bengoechea JA. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*. Carbohydr Res. 2003 Nov 14;338(23):2521-9. DOI: 10.1016/s0008-6215(03)00305-7
131. Kapatral V, Minnich SA. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. Mol Microbiol. 1995 Jul;17(1):49-56. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010049.x
132. Reibel R, Ernst RK, Gowen BB, Miller SI, Hinnebusch BJ. Variation in lipid A structure in the pathogenic *Yersiniae*. Mol Microbiol. 2004 Jun;52(5):1363-73. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04059.x
133. Deuschle E, Keller B, Siegfried A, Manncke B, Spaeth T, Köberle M, et al. Role of β 1 integrins and bacterial adhesins for Yop injection into leukocytes in *Yersinia enterocolitica* systemic mouse infection. Int J Med Microbiol. 2016 Feb;306(2):77-88. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.12.001
134. Keller B, Mühlenkamp M, Deuschle E, Siegfried A, Mössner S, Schade J, et al. *Yersinia enterocolitica* exploits different pathways to accomplish adhesion and toxin injection into host cells. Cell Microbiol. 2015 Aug;17(8):1179-204. DOI: 10.1111/cmi.12429
135. Weening EH, Cathelyn JS, Kaufman G, Lawrenz MB, Price P, Goldman WE, Miller VL. The dependence of the *Yersinia pestis* capsule on pathogenesis is influenced by the mouse background. Infect Immun. 2011 Feb;79(2):644-52. DOI: 10.1128/IAI.00981-10
136. Paczosa MK, Fisher ML, Maldonado-Arocho FJ, Meccas J. *Yersinia pseudotuberculosis* uses Ail and YadA to circumvent neutrophils by directing Yop translocation during lung infection. Cell Microbiol. 2014 Feb;16(2):247-68. DOI: 10.1111/cmi.12219
137. Maldonado-Arocho FJ, Green C, Fisher ML, Paczosa MK, Meccas J. Adhesins and host serum factors drive Yop translocation by *Yersinia* into professional phagocytes during animal infection. PLoS Pathog. 2013;9(6):e1003415. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003415
138. Schaake J, Drees A, Grüning P, Uliczka F, Pisano F, Thiermann T, et al. Essential role of invasin for colonization and persistence of *Yersinia enterocolitica* in its natural reservoir host, the pig. Infect Immun. 2014 Mar;82(3):960-9. DOI: 10.1128/IAI.01001-13
139. Joshua GW, Atkinson S, Goldstone RJ, Patrick HL, Stabler RA, Purves J, et al. Genome-wide evaluation of the interplay between *Caenorhabditis elegans* and *Yersinia pseudotuberculosis* during in vivo biofilm formation. Infect Immun. 2015 Jan;83(1):17-27. DOI: 10.1128/IAI.00110-14
140. Erickson DL, Waterfield NR, Vadyvaloo V, Long D, Fischer ER, Ffrench-Constant R, Hinnebusch BJ. Acute oral toxicity of *Yersinia pseudotuberculosis* to fleas: implications for the evolution of vector-borne transmission of plague. Cell Microbiol. 2007 Nov;9(11):2658-66. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00986.x
141. Champion OL, Cooper IAM, James SL, Ford D, Karlyshev A, Wren BW, et al. *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbiology (Reading). 2009 May;155(Pt 5):1516-1522. DOI: 10.1099/mic.0.026823-0
142. Chouikha I, Hinnebusch BJ. *Yersinia*-flea interactions and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague. Curr Opin Microbiol. 2012 Jun;15(3):239-46. DOI: 10.1016/j.mib.2012.02.003
143. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 28;103(9):3375-80. DOI: 10.1073/pnas.0507749103
144. Dersch P, Isberg RR. An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. Infect Immun. 2000 May;68(5):2930-8. DOI: 10.1128/iai.68.5.2930-2938.2000

Информация об авторах:

Вагайская Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0117
E-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0117
E-mail: dentovskaya@obolensk.org

Information about authors:

Anastasiya S. Vagaiskaya, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, major researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: dentovskaya@obolensk.org

Экспрессные методы при исследовании пищевых продуктов

Л.А.Краева¹, Е.В.Смирнова², И.А.Деревянченко²

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

²Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Заболеемость населения Российской Федерации острыми кишечными инфекциями продолжает оставаться причиной значительного социального и многомиллиардного экономического ущерба. При этом этиологический фактор заболеваний удается установить лишь в одной трети случаев. Поскольку основным путем передачи острых кишечных инфекций является пищевой путь, а факторами передачи – продукты питания, то вполне обоснована все возрастающая необходимость в разработке и использовании для контроля пищевых продуктов быстрых и эффективных методов микробиологической диагностики.

В настоящее время они представлены в нескольких вариантах: полностью автоматизированные системы и приборы для микробиологической диагностики пищевых продуктов; ручные тесты; приборы и ручные тесты для ускорения отдельных этапов микробиологической диагностики. В основе всех представленных разработок лежат различные методы.

Полностью автоматизированные системы и приборы для микробиологической диагностики пищевых продуктов имеют высокую производительность (до нескольких сотен анализов одновременно), что очень удобно и востребовано в крупных лабораториях. При большой цене приборов экономическая эффективность от их использования в таких лабораториях также высока. Для лабораторий с небольшим потоком проб на исследование более предпочтительными являются ручные тесты или наборы, а также питательные среды для микробиологической диагностики пищевых продуктов или для ускорения отдельных ее этапов.

Высокие показатели качества и скорости анализа пищевых продуктов являются необходимым условием для снижения заболеваемости, обусловленной потреблением недоброкачественной в микробиологическом плане пищи, и экономического ущерба от заболеваний.

Ключевые слова: пищевые продукты, экспрессные методы, лабораторная диагностика

Для цитирования: Краева Л.А., Смирнова Е.В., Деревянченко И.А. Экспрессные методы при исследовании пищевых продуктов. Бактериология. 2020; 5(4): 52–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-52-59

Rapid methods in the study of food

L.A.Kraeva¹, E.V.Smirnova², I.A.Derevyanchenko²

¹St.-Petersburg Pasteur Institute, St.-Petersburg, Russian Federation;

²Eastern Branch of the Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St.-Petersburg, Russian Federation

The incidence of acute intestinal infections among the population of the Russian Federation continues to cause significant social and multibillion-ruble economic damage. At the same time, the etiological factor of diseases can be established only in one third of cases. Since the main route of transmission of acute intestinal infections is the food pathway, and the factors of transmission are food, it is quite justified that there is an increasing need to develop and use fast and effective methods of microbiological diagnostics for food control.

Currently, they are presented in several versions: fully automated systems and devices for microbiological diagnostics of food products; manual tests for microbiological diagnostics of food products; devices and manual tests to speed up some stages of microbiological diagnostics. All the presented developments are based on various methods.

Fully automated systems and devices for microbiological diagnostics of food products have a very high productivity (up to several hundred analyses at a time), which is very convenient and in demand in large laboratories. With the high price of devices, the economic efficiency of their use in such laboratories is also high. For laboratories with a small flow of samples for research, manual tests or kits are more preferable, as well as nutrient media for microbiological diagnostics of food products or to speed up its some stages.

High quality and speed of food analysis are essential for reducing morbidity due to consumption of poor quality in microbiological terms of food and economic loss from diseases.

Key words: food products, express methods, laboratory diagnostics

For citation: Kraeva L.A., Smirnova E.V., Derevyanchenko I.A. Rapid methods in the study of food. Bacteriology. 2020; 5(4): 52–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-52-59

Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

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

Телефон: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 07.09.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Liudmila A. Kraeva, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of medical bacteriology, St.-Petersburg Pasteur Institute

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

Phone: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 07.09.2020, accepted for publication 25.12.2020

По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году» отмечается, что острые кишечные инфекции (ОКИ) неустановленной этиологии находятся на втором месте в рейтинге инфекционных болезней по величине экономического ущерба. Так, экономический ущерб от ОКИ, сальмонеллез, бактериальной дизентерии (шигеллеза), псевдотуберкулеза, брюшного тифа, паратифов А, В и С составил в 2019 г. более 27 млрд рублей. В 2019 г. в Российской Федерации зарегистрировано 780 497 случаев ОКИ, причем только 37,1% из них составили заболевания с установленной этиологией. В то же время в документе указывается, что около 4% проб пищевой продукции не соответствовало гигиеническим нормативам при исследовании на предмет микробиологической безопасности. А удельный вес готовых блюд, не отвечающих гигиеническим требованиям, колеблется в различных субъектах РФ до от 2 до 12%.

Очень большое значение для производителей и реализаторов продуктов питания имеет скорость исследования на микробиологическую безопасность. Качество и скорость анализа пищевых продуктов – залог снижения заболеваемости, обусловленной потреблением недоброкачественной в микробиологическом плане пищи, и экономического ущерба от заболеваний. Поэтому при исследовании пищевых продуктов на первое место выходят экспрессные методы исследования. В настоящее время они представлены в нескольких вариантах.

В крупных лабораториях для анализа большого количества проб могут быть использованы **полностью автоматизированные системы и приборы для микробиологической диагностики пищевых продуктов**.

Одним из первых методов, успешно примененным в экспрессной микробиологии пищевых продуктов, является **импедансный метод**. В 1977 г. он был впервые испробован на клинических образцах, что позволило получать данные о бактериальной обсемененности биологической пробы в течение 2,5 ч [1]. В 1998 г. были опубликованы первые результаты и перспективы использования этого метода при оценке качества пищевых продуктов [2], а чуть позже, в 1999 г., импедансный метод уже использовался для выявления контаминации сырья и продуктов питания на всех этапах технологического процесса [3]. Спустя десятилетие ученые разработали портативные биосенсоры на основе импеданса для оценки качества молока [4]. В то же время другая группа исследователей разработала биосенсоры с использованием этого же метода для исследования любых пищевых продуктов, причем без предварительной обработки изучаемых проб [5]. При сравнении нескольких быстрых методов исследования пищевой продукции установлено, что метод импеданса позволяет быстро и качественно выявлять бактериальную загрязненность в пробе. Этот метод может быть использован для скрининга больших партий пищевой продукции [6] и выявления штаммов *Escherichia coli* O157:H7 в образцах пищевых продуктов [7].

Импедансная микробиология – это непрямой культуральный метод обнаружения микроорганизмов путем определения электрического импеданса. В последние годы данный метод быстро приобрел спрос именно благодаря своей уни-

версальности и надежности. Экспресс-анализаторы «БакТрак 4300», «БиоТрак 4250», созданные на основе импедансного метода, в настоящее время нашли применение при оценке качества пищевой продукции. Производитель указанных анализаторов – австрийская компания «SY-LAB Geraete GmbH», а ее представитель и дочерняя фирма в РФ – ООО «СИ-ЛАБ».

Принцип действия микробиологических анализаторов «БакТрак 4300» и «БиоТрак 4250» основан на методе измерения импеданса. В процессе метаболизма микроорганизмы расщепляют питательные вещества с образованием низкомолекулярных заряженных молекул, которые меняют проводимость жидких питательных сред путем снижения их сопротивления. В питательной среде такое изменение может быть технически измерено с использованием как минимум двух электродов. Импедансный анализ является динамическим процессом, то есть он отображает метаболическую активность растущих микроорганизмов во времени. Микробиологический анализатор «БакТрак 4300» регистрирует два параметра: М-параметр (импеданс среды) и Е-параметр (электродный импеданс), которые могут учитываться отдельно или в комбинации. Использование метода разделения импеданса для регистрации роста микроорганизмов обеспечивает универсальность использования прибора. В нем можно устанавливать одновременно две независимые температуры. Каждая температурная зона имеет 32 измерительных места, что дает возможность исследовать одновременно 64 образца. При необходимости увеличения количества проб для исследования возможно подключение дополнительного модуля прибора на 64 образца. Компьютерная программа позволяет управлять работой 12 модулей; это позволяет одновременно исследовать 768 образцов. Измерительная система прибора высоко чувствительна к микробным метаболитам и позволяет проводить измерения в селективных питательных средах с высоким содержанием солей, что особенно важно для обнаружения патогенных микроорганизмов.

В течение всего нескольких часов (в зависимости от вида патогена) экспресс-анализатор «БакТрак 4300» позволяет выявлять в пробе ряд микроорганизмов: аэробные мезофильные микроорганизмы, психрофильные, термофильные микроорганизмы, энтеробактерии, энтерококки, *Pseudomonas* spp., колиформные бактерии, *E. coli*, сальмонеллы, листерии, лактобациллы, аэробные спорообразующие бактерии, *Staphylococcus aureus*, бактерии, вызывающие порчу пива, клостридии, дрожжи и плесени.

Бактериологический анализатор «БиоТрак 4250» предназначен для относительно малых объемов санитарно-бактериологических исследований, имеющих целью оценку стерильности и обсемененности микроорганизмами различных объектов. Рациональное использование экспресс-анализатора позволяет мониторировать в режиме реального времени динамику роста культур бактерий, обсеменяющих значимые в санитарном отношении объекты. Эта компактная система отвечает всем современным требованиям в области обеспечения безопасности и контроля качества готовой продукции и позволяет одновременно анализировать до 21 образца. Прибор «БиоТрак 4250» позволяет автоматически определять основные санитарно-значимые

показатели. Основным преимуществом микробиологического анализатора «БиоТрак 4250» является автоматическая регистрация и обработка результатов. Это позволяет получать объективные результаты, сократить время исследования, уменьшить трудозатраты и значительно снизить себестоимость анализа. Также несомненным достоинством данного прибора является его портативность и компактность.

Эта модель прибора позволяет выявлять в пробах следующие микроорганизмы: аэробные мезофильные микроорганизмы, психрофильные, термофильные микроорганизмы, грамотрицательные бактерии, энтеробактерии, колиформные бактерии, *E. coli*, сальмонеллы, *Pseudomonas* spp., аэробные спорообразующие бактерии, дрожжи и плесени.

При этом исследуемый образец вносится в измерительную ячейку с питательной средой. Если образец имеет плотную структуру, он должен быть предварительно гомогенизирован. Измерительные ячейки помещаются в инкубаторный блок, на приборе устанавливаются параметры измерения. Далее процесс анализа происходит автоматически. Время анализа обычно составляет около 24 ч. При более высокой микробной загрязненности образцов результат может быть получен в течение нескольких часов.

Микробиологический анализатор управляется встроенным портативным компьютером с удобным программным обеспечением в среде Windows. Программное обеспечение позволяет получать полную информацию о процессе измерения и о текущем состоянии каждого образца. Цветная диаграмма состояния каждой ячейки позволяет легко оценивать результаты измерения. Имеется возможность сохранения условий анализа, параметров и калибровочных зависимостей для каждого образца. Универсальная компьютерная программа позволяет совмещать и обмениваться данными с другими программными продуктами.

На базе Федерального центра Госсанэпиднадзора проведены аттестационные испытания, разработаны и утверждены методические указания для проведения бактериологических исследований с использованием экспресс-анализаторов серии «БакТрак» в соответствии с медико-биологическими требованиями и САНПиНом 2.1.4.1074-01. МУК 4.2.2578-10 «Санитарно-бактериологические исследования методом разделенного импеданса» разработаны для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также мониторинг их микробной загрязненности; лабораторий других организаций, аккредитованных в установленном порядке на проведение исследований продовольственного сырья и пищевых продуктов; организаций, независимо от форм собственности осуществляющих производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов в процессе промышленного производства и оборота продукции. «БакТрак 4300» и расходные материалы к нему зарегистрированы Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Приборы «БакТрак 4300» и «БиоТрак 4250» внесены в Реестр средств измерений как кондуктометрические анализаторы для микробиологических исследований.

На основе **калориметрического метода** разработаны и выпущены несколько автоматизированных систем для исследования продуктов питания и напитков. Так, компанией «bioMérieux» выпущена простая, полностью **автоматизированная система быстрого выявления микроорганизмов**, позволяющая определять загрязнение бактериями, дрожжами и плесневыми грибами во многих продуктах питания и напитках, – «BACT/ALERT® 3D». Эта система и оптимизированный для производств диапазон питательных сред обеспечивают выявление широкого спектра микроорганизмов в течение 24–72 ч. Снижение времени определения дрожжей сокращает производственный цикл и ускоряет выпуск продуктов. Эта система не только сокращает сроки выпуска продукта на рынок, но и обеспечивает экономичное производство. Контроль процесса производства в режиме реального времени дает ценную информацию для принятия оперативных решений. Короткое время определения микроорганизмов позволяет предпринять корректирующие действия и надлежащим образом устранять случаи контаминации.

Стандартная система «BACT/ALERT®» состоит из управляющего и инкубационного модулей. Система позволяет одновременно инкубировать и определять микробное загрязнение в 240 отдельных образцах. Модульный дизайн позволяет добавлять до шести инкубационных модулей к одному управляющему модулю, регулируя систему в соответствии со своими задачами.

Каждый флакон «BACT/ALERT®» содержит стерильную питательную среду и оснащен колориметрическим датчиком, который в присутствии CO₂, вырабатываемого растущими микроорганизмами, меняет цвет с серого на желтый. После загрузки флаконов колориметрические датчики подвергаются сканированию каждые десять минут. При определении роста микроорганизмов в системе срабатывают звуковые и визуальные предупредительные сигналы и регистрируются данные образца.

Основные достоинства модульной конструкции «BACT/ALERT®» – **простота использования**, объективные результаты, воспроизводимость и прослеживаемость. Поэтому, начиная с повышения производительности лабораторий и заканчивая сокращением сроков карантинного хранения продукта, система «BACT/ALERT®» имеет большое значение на многих этапах организации производства пищевых продуктов.

Работа с помощью системы «BACT/ALERT® 3D» представляет собой простой, стандартизированный рабочий процесс, который многократно сокращает длительность ручных операций и трудовых затрат, позволяет получать объективные результаты даже при анализе вязких или мутных образцов. При этом система достоверно определяет бактерии, дрожжи и плесневые грибы, не разрушая сам образец. В системе «BACT/ALERT® Dual-T» доступны две температуры инкубации (32,5 и 22,5°C). В ней возможно исследование продуктов и напитков с низкой и высокой кислотностью.

При сравнительном исследовании различных автоматизированных систем для выявления микроорганизмов было установлено, что «BACT/ALERT® 3D» отличается относительно невысокой ценой, надежностью и простотой в обслуживании [8].

Следующая инновационная разработка на основе колориметрической идентификации – анализатор «VITEK 2

Compact». Это полностью автоматизированная система, гарантирующая превосходное качество рутинного процесса идентификации микроорганизмов. Она отличается повышенной производительностью за счет автоматической идентификации. В результате проведенных многочисленных независимых исследований было установлено, что 98,3% микроорганизмов были правильно идентифицированы с помощью анализатора «VITEK 2 Compact» [9]. Этот прибор включает обширную идентификационную базу данных, позволяющую выявлять широкий спектр микроорганизмов. Все стадии идентификации, от считывания показаний прибора до регистрации результатов, автоматизированы, что позволяет оптимизировать рабочий процесс. Поскольку в процессе работы системы используются карты со штрих-кодами, обеспечивается полная прослеживаемость и сводится к минимуму риск ошибок считывания.

Система считывает карты VITEK последнего поколения, содержащие 64 лунки, каждые 15 мин при трех различных длинах волн для обеспечения точности. Этот метод позволяет проанализировать больше данных, что повышает точность результатов. Время до получения результата составляет от 2 до 18 ч (в зависимости от вида микроорганизма). Так, например, результаты по грамотрицательным бактериям или грамположительным коккам могут быть готовы через 2–8 ч, по анаэробным бактериям – в течение 6 ч, а дрожжеподобным грибам – через 18 ч. Программное обеспечение «VITEK® 2 Compact» предельно понятно и не требует большого количества времени для обучения, что повышает производительность.

Основными преимуществами «VITEK® 2 Compact» для идентификации микроорганизмов являются: повышенная производительность и безопасность за счет автоматизации, быстрота получения результатов, высочайшая точность, соответствие стандартам BAM и ISO 7218, возможность создавать свою базу данных, интуитивно понятные система и программное обеспечение, полная прослеживаемость анализируемой пробы благодаря картам со штрих-кодом.

В последние годы большую популярность приобрела **технология фермент-связанного флуоресцентного анализа (ELFA)**. В 2010 г. эта технология и прибор на ее основе были испытаны при исследовании материала на клостридии [10], а в 2013 г. эта методология была признана лучшей при исследовании продуктов питания на наличие листерий [11]. Компания «bioMérieux» выпустила автоматизированную систему для выявления патогенных микроорганизмов в продуктах питания «VIDAS® UP». Эта система предусматривает быстрые и упрощенные протоколы в сочетании с признанной надежностью «VIDAS®». Протоколы созданы на основе новейшего метода рекомбинантных фаговых белков.

Компанией «bioMérieux» производится целая линейка приборов «VIDAS», характеризующихся широким спектром решаемых задач, высокой скоростью идентификации (от нескольких часов до 48 ч), высокой специфичностью и полной автоматизацией. Так, с помощью системы «VIDAS» можно выявлять штаммы сальмонелл, листерий, *E. coli* O157 (включая H7), кампилобактер, стафилококковые энтеротоксины. При этом тест «VIDAS UP» для определения *E. coli* O157 (включая H7) является самым быстрым мето-

дом скрининга данного микроорганизма, позволяющим получать результаты менее чем за 8 ч.

Еще одной недорогой и быстрой альтернативой стандартным культуральным методам является следующая разработка компании «bioMérieux» – «Система TEMPO®», использующая **специальные питательные среды TEMPO с флуоресцентным индикатором**.

Для выполнения количественного учета микроорганизмов система требует наличия двух эргономичных рабочих станций: станции пробоподготовки и станции учета результатов. На станции учета результатов определяется количество (КОЕ/г) исходного продукта. На основании количества и размера положительных лунок (флуоресцирующих или нефлуоресцирующих) прибор «TEMPO®» рассчитывает количество микроорганизмов в исходном образце с помощью статистических методов.

Разработанная система была апробирована при исследовании образцов на наличие энтеробактерий. Результаты были выполнены качественно и получены через 24 ч [12]. При исследовании соевых продуктов с помощью системы «TEMPO®» также были получены достоверные результаты о наличии различных микроорганизмов в пробах [13]. При сравнении различных методов исследования молока были получены результаты, доказывающие преимущество системы «TEMPO®» [14].

Указанная система позволяет за 24 ч выявлять и определять количество энтеробактерий, колиформных бактерий, в том числе *E. coli*, аэробных мезофильных микроорганизмов, стафилококков, *Bacillus cereus*; 40–48 ч необходимо для выявления молочнокислых бактерий и 72–76 ч – для дрожжей и плесневых грибов.

Цитометрический метод обнаружения и подсчета микроорганизмов в режиме реального времени завоевал большую популярность в клинической практике. В последние годы компания «bioMérieux» выпустила аналитические анализаторы на основе цитометрии для санитарной микробиологии.

Анализатор для проточной цитометрии «CHEMUNEX®» – это система выявления микроорганизмов в режиме реального времени, полностью автоматизированная. При сравнении различных методов анализатор «CHEMUNEX®» показал наилучшие результаты по скорости выявления микроорганизмов и чувствительности метода [15].

Методика маркировки клеток «CHEMUNEX» обеспечивает маркировку всех жизнеспособных микроорганизмов, включая растущие в условиях стресса (например, в технической воде, лишенной питательных веществ) или при наличии ингибиторов роста. Автоматические, сверхбыстрые анализаторы «CHEMUNEX» с чрезвычайно высокой чувствительностью осуществляют непосредственную маркировку и поклеточный подсчет микроорганизмов. Получение результатов возможно в течение нескольких минут, иногда – через 24 ч (50 ч для плесневых грибов). Это анализатор с высокой пропускной способностью: он позволяет обрабатывать до 48 образцов на партию или 50 тестов/час. При этом происходит автоматическая маркировка и учет результатов.

Быстрое получение информации о микробной загрязненности пробы помогает сократить продолжительность производственного цикла за счет сокращения сроков карантинно-

го хранения конечного продукта. Поэтому продукция, не отвечающая должным спецификациям, может быть забракована до ее помещения в упаковки, что позволит снизить риск поступления некачественного продукта в реализацию.

Еще один автоматический анализатор по обнаружению и подсчету микроорганизмов в режиме реального времени – система «SCANRDI®».

Работа системы «SCANRDI®» основана на **методе твердофазной цитометрии**: комбинации флуоресцентной маркировки клеток и лазерного сканирования. Все жизнеспособные микроорганизмы маркируются передовой системой реактивов, которая за счет ферментативного расщепления высвобождает свободный флуорохром в цитоплазме всех метаболически активных (жизнеспособных) клеток. Система «SCANRDI®» выявляет все микроорганизмы, меченные реактивами Fluoaasure.

Микроорганизмы фильтруются на специальной мембране, к которой добавляют раствор для флуоресцентной маркировки всех жизнеспособных клеток. Меньше чем через 3 мин под действием лазерного излучения определяются все жизнеспособные клетки, фиксированные на одноуровневой мембране (диаметр пор 0,22 мкм). Результат прямого подсчета жизнеспособных клеток мгновенно отображается на карте сканирования, что позволяет определять точное расположение каждого микроорганизма на мембране.

Эта передовая технология идеально подходит для контроля процесса производства и конечного продукта, дает достоверные результаты уже в течение 90 мин и позволяет выявлять все жизнеспособные микроорганизмы, такие как бактерии, споры бактерий, дрожжевые, плесневые грибы и их споры. Благодаря своей совершенной чувствительности прибор «SCANRDI®» способен обнаружить единственную жизнеспособную клетку в одном образце. Этот метод и прибор для его осуществления признан лучшим по чувствительности и скорости получения результата [16].

Через три часа с момента забора образцов до получения результатов можно узнать, следует ли продолжить производство или реализацию данного продукта или нужно немедленно принять меры к приостановке. Таким образом, с помощью этой системы можно получать результат не в ретроспективе, а в режиме реального времени.

Кроме фенотипических тестов выявления патогенов в продуктах питания, специалистами компании «bioMérieux» усовершенствован молекулярный метод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и выпущен продукт «GENE-UP®». Он позволяет быстро получать надежные результаты при выявлении патогенных микроорганизмов, ассоциированных с продуктами питания.

С помощью системы «GENE-UP®» можно определять в пробе сальмонеллы, листерии, *E. coli* O157:H7, энтерогемотоксические *E. coli*, норовирусы, вирусы гепатита А и Е. Пробоподготовка занимает 8–24 ч, используется упрощенный механический лизис в течение 5 мин, амплификация и учет результатов осуществляются в течение 1 ч.

Для ускорения некоторых этапов при микробиологическом исследовании пищевых продуктов можно воспользоваться рядом разработок, которые с успехом применяются в клинической лабораторной диагностике. Например, **временная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS)** позволя-

ет значительно ускорить результат идентификации и его достоверность.

MALDI-TOF масс-спектрометрия определяет соотношение масса/заряд для отдельных частиц в биопробе и позволяет получить бактериальный спектр в течение нескольких минут. База данных используется для сравнения полученных масс-спектров неизвестных микроорганизмов со спектрами достоверно идентифицированных микроорганизмов из базы данных. В ходе сравнения на основе корреляции полученных пиков, их интенсивности высчитывается коэффициент соответствия. Последние публикации на тему MALDI-TOF масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что данный метод является более эффективным методом идентификации бактерий и грибов, чем большинство биохимических тестов [17]. У масс-спектрометров различных производителей есть слабые и сильные стороны [18]. Тем не менее эти приборы однозначно помогают сократить время анализа как минимум на сутки.

Небольшие лаборатории с малым объемом исследований пищевых продуктов, скорее всего, отдадут предпочтение недорогому портативному оборудованию или тестам, позволяющим быстро получать информацию о микробиологическом качестве продукции. **Разработан ряд ручных тестов для микробиологической диагностики пищевых продуктов.** Так, на рынке лабораторного обеспечения санитарно-микробиологических исследований существуют портативные наборы, **основанные на флуоресцентной цитометрии**, которые позволяют вести прямой учет микробных клеток в процессе их роста в специальной среде – тесты «СимПлэйт».

В настоящее время разработаны тесты «СимПлэйт» для обнаружения, учета и идентификации возбудителей кишечных инфекций в пищевых продуктах [19]. В России эти тесты представляет компания «ЗИП-И». С помощью флуоресцентной и калориметрической детекции тесты позволяют определять за 24 ч общее количество микроорганизмов в пробе, количество колиформных и энтеробактерий, в том числе *E. coli*, за 48 ч – дрожжи, плесени, кампилобактер.

Легкие и удобные в эксплуатации тесты «СимПлэйт» обладают следующими преимуществами: позволяют в широком диапазоне вести подсчет микроорганизмов; не требуют многократных разведений; гарантируют воспроизводимый точный результат; имеют простую интерпретацию, основанную на визуальном различии позитивного и негативного результата; позволяют получить быстрый результат (за 24–48 ч).

В определенных ситуациях могут помочь **тесты для латексной агглютинации**. Метод латексной агглютинации является вариантом реакции пассивной гемагглютинации. Латексные частицы полистирена с адсорбированными на них молекулами антител вступают в реакцию и агглютинируют с соответствующими антигенами микроорганизмов. Тщательно разработанные наборы позволяют достигать специфичности метода 95–98% [20]. При этом скорость анализа составляет всего 2–3 мин.

Среди отечественных производителей можно отметить продукцию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболенск), который выпускают латексные тесты: *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O104:H4. Из зарубежных производителей вы-

Таблица. Характеристика экспресс-методов по времени исследования		
Используемый метод	Наименование приборов, диагностических наборов	Время исследования (этапа)
Импедансный метод	Анализатор «БакТрак 4300», Анализатор «БиоТрак 4250»	4–24 ч
Колориметрическая методика	Система «БАСТ/ALERT® 3D», анализатор «VITEK 2 Compact»	24–72 ч 2–18 ч
Фермент-связанный флуоресцентный анализ	Система «VIDAS»	4–48 ч
Питательные среды «ТЕМПО» с флуоресцентным индикатором	Система «ТЕМПО®»	24–48 (72) ч
Проточная цитометрия	Анализатор «CHEMUNEX®»	1–24 ч
Твердофазная цитометрия	Система «SCANRDJ®»	10–90 мин
ПЦР в реальном времени	Система детекции «GENE-UP®»	9–25 ч
Флуоресцентная и колориметрическая детекция	тесты «СимПлэйт»	24–48 ч
Времяпролетная масс-спектрометрия	«MALDI Biotyper», «Vitek MS»	2–3 мин
Латексная агглютинация	Наборы для латексной агглютинации	2–3 мин
Иммунохроматографический анализ	Иммунохроматографические тесты	5–20 мин
Биохимическая идентификация с хромогенными субстратами	Наборы «RapID»	4 ч
Хромогенные среды для посева	Хромогенные среды	24–48 ч

деляется компания «Oxoid» (Великобритания), «Remel» (США) / «Thermo Fisher Scientific» и их представитель в России «Biovitrum», которые предлагают латексные наборы для выявления стрептококков, стафилококков, клостридий, энтерогеморрагических *E. coli*, легионелл, листерий, сальмонелл, шигелл. Метод латексной агглютинации быстр, нагляден и удобен в использовании, не требует дополнительного лабораторного оснащения для проведения исследований.

Очень удобны в использовании иммунохроматографические тесты, в основе которых лежит **иммунохроматографический анализ (ИХА)** – метод, основанный на разделении частиц методом парной связки и реакции между антигеном в биопробе и мечеными золотом моноклональными антителами на твердой основе. Данный вид анализа проводится с помощью специальных экспресс-тестов, тест-полосок или тест-кассет.

Метод ИХА характеризуется простотой постановки, высокой специфичностью и скоростью выполнения анализа (несколько минут). Его часто используют для быстрого скрининга качества пищевой продукции [21].

ФБУН ГНЦПМБ (Оболенск) производит иммунохроматографические тесты для экспресс-выявления и идентификации листерий, возбудителей туляремии, чумы, холеры O1-группы, спор возбудителя сибирской язвы. Компания «Biovitrum» поставляет в РФ продукцию «Хрест» – наборы для прямого качественного определения токсинов А и/или В *Clostridium difficile*.

При наличии «чистой» культуры для ускорения идентификации выделенных микроорганизмов можно воспользоваться наборами «RapID» для **биохимической идентификации** за 4 ч, в которых использованы традиционные и хромогенные субстраты.

Использование таких наборов позволяет получать результат идентификации бактерий не через 24 ч, как при обычных биохимических тестах, а через 4 ч [22]. Компания «Biovitrum» поставляет в РФ наборы производства «Remel» для идентификации энтеробактерий, глюкозоферментирующих, оксидазо-положительных грамотрицательных палочек, стафи-

лококков, стрептококков, дрожжей, клинически значимых анаэробных бактерий (Грамм+ и Грамм-).

Для легкой дифференциации и быстрой предварительной идентификации микроорганизмов в мировой бактериологической практике все более широкое применение получают **хромогенные среды** [23, 24]. Принцип действия заключается в образовании окрашенных веществ (индикаторов) в результате взаимодействия высокоспецифичных ферментов бактерий с компонентами среды.

Из основных производителей хромогенных сред следует назвать «Oxoid», «Merck», «bioMerieux», «HiMedia», «Fluka2», «Sifin», «Biolife». Выпуск освоен и отечественным производителем – ГНЦ ПМБ (Оболенск), который производит хромогенную среду для обнаружения колиформных бактерий и *E. coli*. Компания «Biovitrum» поставляет в РФ хромогенные среды «Brilliance™ Oxoid»: для быстрой изоляции и идентификации 5 клинически важных видов *Candida* spp. и среду для идентификации колиформных бактерий, энтерококков, бактерий родов *Proteus*, *Morganella* и *Providencia* spp.; она же позволяет отличать *Staphylococcus saprophyticus* от других стафилококков.

Таким образом, существует большое количество более и менее дорогих методов экспрессной диагностики (таблица), которые реализованы в виде автоматизированных станций, приборов и диагностических наборов, способных значительно сократить время исследования пищевой продукции или сырья для ее изготовления с целью оперативного контроля за качеством продуктов питания. Экономический эффект от повсеместного использования экспресс-методов будет многократно превышать материальные затраты на приобретение соответствующего оборудования и диагностических наборов.

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

- Throm R, Specter S, Strauss R, Friedman H. Detection of bacteriuria by automated electrical impedance monitoring in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1977 Sep;6(3):271-3
- Model investigations of the impedance effectiveness concerning bacterial relevant to food hygiene]. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998 Nov;45(9):551-9.
- Wawerla M, Stolle A, Schalch B, Eisgruber H. Impedance microbiology: applications in food hygiene. *J Food Prot.* 1999 Dec;62(12):1488-96. DOI: 10.4315/0362-028x-62.12
- García-Aljaro C, Muñoz-Berbel X, Muñoz FJ. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. *Biosens Bioelectron.* 2009 Feb 15;24(6):1712-6. DOI: 10.1016/j.bios.2008.08.047
- Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):631-46. DOI: 10.1128/CMR.00120-13
- Monzó J, Insua I, Fernandez-Trillo F, Rodriguez P. Fundamentals, achievements and challenges in the electrochemical sensing of pathogens. *Analyst.* 2015 Nov 7;140(21):7116-28. DOI: 10.1039/c5an01330e
- Wang R, Lum J, Callaway Z, Lin J, Bottje W, Li Y. A Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors (Basel).* 2015 Dec 15;5(4):791-803. DOI: 10.3390/bios5040791
- Totty H, Ullery M, Spontak J, Viray J, Adamik M, Katzin B, Dunne WM Jr, Deol P. A controlled comparison of the BacT/ALERT® 3D and VIRTUO™ microbial detection systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Oct;36(10):1795-1800. DOI: 10.1007/s10096-017-2994-8
- Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Jun;58(2):191-8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.008
- Chmelarová E, Skapová T. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile* [Practical experience with the detection *Clostridium difficile*]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010 Jun;16(3):86-9.
- Benetti TM, Monteiro CL, Beux MR, Abrahão WM. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: a comparison with conventional methods. *Braz J Microbiol.* 2014 Jan 15;44(3):791-4. DOI: 10.1590/s1517-83822013000300019
- Paulsen P, Borgetti C, Schopf E, Smulders FJ. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various foods with a new automated most-probable-number method compared with petrifilm and international organization for standardization procedures. *J Food Prot.* 2008 Feb;71(2):376-9. DOI: 10.4315/0362-028x-71.2.376
- Katase M, Tsumura K. Enumeration of micro-organisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Nov;53(5):539-45. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03143.x
- Loss G, Apprich S, Kneifel W, von Mutius E, Genuneit J, Braun-Fahrlander C; GABRIEL Study Group. Short communication: appropriate and alternative methods to determine viable bacterial counts in cow milk samples. *J Dairy Sci.* 2012 Jun;95(6):2916-8. DOI: 10.3168/jds.2011-4897
- Méheust D, Gangneux JP, Cann PL. Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *J Occup Environ Hyg.* 2013;10(8):455-9. DOI: 10.1080/15459624.2013.800955
- McDonald CP, Colvin J, Robbins S, Barbara JA. Use of a solid-phase fluorescent cytometric technique for the detection of bacteria in platelet concentrates. *Transfus Med.* 2005 Jun;15(3):175-83. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2005.00569.x
- Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* 2011 Jan 25;6(1):e16424. DOI: 10.1371/journal.pone.0016424
- de Alegría Puig CR, Torres MF, Marfil-Pérez E, Fernández MIR, Del Río MC, Balbín JA, Martínez-Martínez L. Comparison between Vitek MS, Bruker Biotyper, Vitek2, and API20E for differentiation of species of the genus *Raoultella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Mar;38(3):467-470. DOI: 10.1007/s10096-018-03444-4
- Аспандиярова М.Т. Микробиологический экспресс-анализ молочной продукции. *Переработка молока.* 2010;8(130):12-13.
- Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1999 Feb;37(2):396-9. DOI: 10.1128/JCM.37.2.396-399.1999
- Ueda S, Iwase M, Kuwabara Y. Evaluation of immunochromatography for the rapid and specific identification of *Listeria monocytogenes* from food. *Biocontrol Sci.* 2013;18(3):157-61. DOI: 10.4265/bio.18.157
- Maloney S, Engler C, Norton R. Evaluation of the Remel RapID NF plus rapid biochemical method for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun;52(6):2175-6. DOI: 10.1128/JCM.00025-14
- Greenwood M, Willis C, Doswell P, Allen G, Pathak K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J Appl Microbiol.* 2005;99(6):1340-5. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02734.x
- Lee SK, Song KY, Chon JW, Kim DH, Seo KH. Evaluation of Selective-Enrichment and Chromogenic Media for *Salmonella* Detection in Raw Shell Egg Contents with a Low Microbial Load. *Foodborne Pathog Dis.* 2017 Jul;14(7):414-418. DOI: 10.1089/fpd.2016.2250

References

- Throm R, Specter S, Strauss R, Friedman H. Detection of bacteriuria by automated electrical impedance monitoring in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1977 Sep;6(3):271-3
- Model investigations of the impedance effectiveness concerning bacterial relevant to food hygiene]. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998 Nov;45(9):551-9.
- Wawerla M, Stolle A, Schalch B, Eisgruber H. Impedance microbiology: applications in food hygiene. *J Food Prot.* 1999 Dec;62(12):1488-96. DOI: 10.4315/0362-028x-62.12
- García-Aljaro C, Muñoz-Berbel X, Muñoz FJ. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. *Biosens Bioelectron.* 2009 Feb 15;24(6):1712-6. DOI: 10.1016/j.bios.2008.08.047
- Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):631-46. DOI: 10.1128/CMR.00120-13
- Monzó J, Insua I, Fernandez-Trillo F, Rodriguez P. Fundamentals, achievements and challenges in the electrochemical sensing of pathogens. *Analyst.* 2015 Nov 7;140(21):7116-28. DOI: 10.1039/c5an01330e
- Wang R, Lum J, Callaway Z, Lin J, Bottje W, Li Y. A Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors (Basel).* 2015 Dec 15;5(4):791-803. DOI: 10.3390/bios5040791
- Totty H, Ullery M, Spontak J, Viray J, Adamik M, Katzin B, Dunne WM Jr, Deol P. A controlled comparison of the BacT/ALERT® 3D and VIRTUO™ microbial detection systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Oct;36(10):1795-1800. DOI: 10.1007/s10096-017-2994-8

9. Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Jun;58(2):191-8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.008
10. Chmelarová E, Skapová T. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile* [Practical experience with the detection *Clostridium difficile*]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010 Jun;16(3):86-9.
11. Benetti TM, Monteiro CL, Beux MR, Abrahão WM. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: a comparison with conventional methods. *Braz J Microbiol.* 2014 Jan 15;44(3):791-4. DOI: 10.1590/s1517-83822013000300019
12. Paulsen P, Borgetti C, Schopf E, Smulders FJ. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various foods with a new automated most-probable-number method compared with petrifilm and international organization for standardization procedures. *J Food Prot.* 2008 Feb;71(2):376-9. DOI: 10.4315/0362-028x-71.2.376
13. Katase M, Tsumura K. Enumeration of micro-organisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Nov;53(5):539-45. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03143.x
14. Loss G, Apprich S, Kneifel W, von Mutius E, Genuneit J, Braun-Fahrlander C; GABRIEL Study Group. Short communication: appropriate and alternative methods to determine viable bacterial counts in cow milk samples. *J Dairy Sci.* 2012 Jun;95(6):2916-8. DOI: 10.3168/jds.2011-4897
15. Méheust D, Gangneux JP, Cann PL. Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *J Occup Environ Hyg.* 2013;10(8):455-9. DOI: 10.1080/15459624.2013.800955
16. McDonald CP, Colvin J, Robbins S, Barbara JA. Use of a solid-phase fluorescent cytometric technique for the detection of bacteria in platelet concentrates. *Transfus Med.* 2005 Jun;15(3):175-83. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2005.00569.x
17. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* 2011 Jan 25;6(1):e16424. DOI: 10.1371/journal.pone.0016424
18. de Alegría Puig CR, Torres MF, Marfil-Pérez E, Fernández MIR, Del Río MC, Balbín JA, Martínez-Martínez L. Comparison between Vitek MS, Bruker Biotyper, Vitek2, and API20E for differentiation of species of the genus *Raoultella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Mar;38(3):467-470. DOI: 10.1007/s10096-018-03444-4
19. Aspandiyarova M.T. Mikrobiologicheskii ekspres-analiz molochnoi produktsii. *Milk Processing.* 2010;8(130):12-13. (In Russian).
20. Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1999 Feb;37(2):396-9. DOI: 10.1128/JCM.37.2.396-399.1999
21. Ueda S, Iwase M, Kuwabara Y. Evaluation of immunochromatography for the rapid and specific identification of *Listeria monocytogenes* from food. *Biocontrol Sci.* 2013;18(3):157-61. DOI: 10.4265/bio.18.157
22. Maloney S, Engler C, Norton R. Evaluation of the Remel RapID NF plus rapid biochemical method for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun;52(6):2175-6. DOI: 10.1128/JCM.00025-14
23. Greenwood M, Willis C, Doswell P, Allen G, Pathak K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J Appl Microbiol.* 2005;99(6):1340-5. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02734.x
24. Lee SK, Song KY, Chon JW, Kim DH, Seo KH. Evaluation of Selective-Enrichment and Chromogenic Media for *Salmonella* Detection in Raw Shell Egg Contents with a Low Microbial Load. *Foodborne Pathog Dis.* 2017 Jul;14(7):414-418. DOI: 10.1089/fpd.2016.2250

Информация об авторах:

Смирнова Елена Викторовна, заведующая бактериологической лабораторией, врач-бактериолог Восточного филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург»
 Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12
 E-mail: elenasmirno@yandex.ru

Деревянченко Ирина Анатольевна, биолог бактериологической лаборатории Восточного филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург»
 Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12
 E-mail: tamiirina110804@mail.ru

Information about authors:

Elena V. Smirnova, head of the bacteriological laboratory, doctor-bacteriologist, Eastern Branch of Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg
 Address: 12 Novo-Alexandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation
 E-mail: elenasmirno@yandex.ru

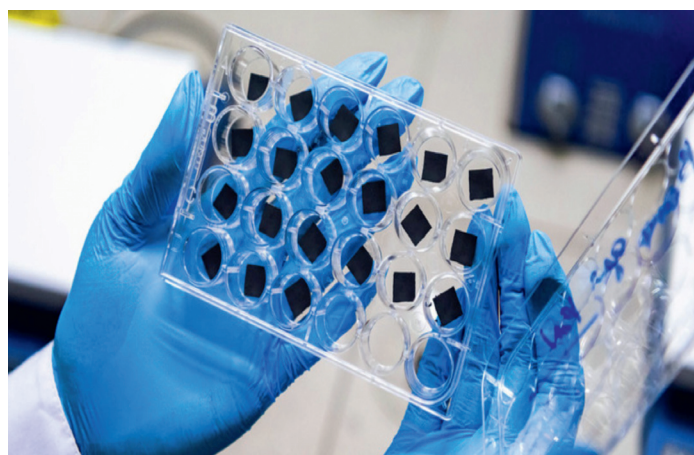
Irina A. Derevyanchenko, biologist of the bacteriological laboratory, Eastern Branch of Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg
 Address: 12 Novo-Alexandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation
 E-mail: tamiirina110804@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Российские ученые нашли новый способ борьбы с бактериями

Ученые из Московского института стали и сплавов создали нанопокрyтия с антибактериальными и противогрибковыми свойствами, за сутки почти полностью уничтожающие болезнетворных микробов. Механизм действия – прямой физический контакт с игловидной поверхностью нанопленки на основе нитрида бора. Полагают, что этот подход будет перспективен в хирургии имплантатов и стоматологии.

Нанозффект: российские ученые нашли новый способ борьбы с бактериями [Electronic resource]. RT на русском. URL: <https://russian.rt.com/science/article/781338-nanoplyonki-protiv-mikrobov> (accessed 08.12.2020).



Обеспечение требований биологической безопасности при проведении биотехнологических процессов с микроорганизмами I–IV групп патогенности

Е.А.Тюрин, Л.В.Чекан

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

Рассматривается вопрос обеспечения и контроля требований биологической безопасности в подразделениях, выполняющих работы с микроорганизмами I–IV групп патогенности/опасности на биотехнологическом оборудовании. Показано, что специфика производства биотехнологической продукции требует неукоснительного соблюдения требований и положений санитарно-эпидемиологических нормативно-методических документов, устанавливающих требования, в том числе безопасности, на всех этапах технологического процесса.

Ключевые слова: биологическая безопасность, микроорганизмы, биотехнология, техногенные ситуации

Для цитирования: Тюрин Е.А., Чекан Л.В. Обеспечение требований биологической безопасности при проведении биотехнологических процессов с микроорганизмами I–IV групп патогенности. Бактериология. 2020; 5(4): 60–64. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-60-64

Ensuring biological safety requirements when carrying out biotechnological processes with microorganisms of I–IV pathogenicity groups

E.A.Tyurin, L.V.Chekan

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

The article deals with the issue of ensuring and monitoring biological safety requirements in units performing work with microorganisms of I–IV pathogenicity/hazard groups using biotechnological equipment. It is shown that the specificity of the production of biotechnological products requires strict observance of the requirements and provisions of sanitary and epidemiological regulatory and methodological documents establishing requirements, including safety, at all stages of the technological process.

Key words: biosafety, microorganisms, biotechnology, technogenic situations

For citation: Tyurin E.A., Chekan L.V. Ensuring biological safety requirements when carrying out biotechnological processes with microorganisms of I–IV pathogenicity groups. Bacteriology. 2020; 5(4): 60–64. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-60-64

Научно-исследовательская (экспериментальная, лекционная), диагностическая и биотехнологическая работа с патогенными микроорганизмами проводится в специфических условиях. Особенности этой работы являются: большие объемы биомассы микроорганизмов, повышенная температура и влажность в рабочих помещениях, контакт с дезинфицирующими веществами, их парами и антибиотиками, физическая и моральная нагрузка, а также

постоянный риск заражения работника патогенным микроорганизмом [1, 2].

Микробиологическая лаборатория различной направленности и ведомственной принадлежности, в которой проводят работы с микроорганизмами – возбудителями инфекционных заболеваний, может являться потенциальным опасным биологическим объектом и, следовательно, источником заражения посторонних лиц, по роду своей профессиональной

Для корреспонденции:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, д. 24

Телефон: (4967) 36-0016

E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 26.11.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Eugene A. Tyurin, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0016

E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 26.11.2020, accepted for publication 25.12.2020

деятельности или в быту контактирующих с сотрудниками лаборатории, находясь в территориальной близости к лаборатории. Помимо этого, существует риск попадания микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний в окружающую среду [3].

Следовательно, главной задачей в создании нормальных условий труда в биотехнологических микробиологических лабораториях является обеспечение безопасности персонала и окружающей среды от заражения микроорганизмами. Поэтому параллельно развитию микробиологии и биотехнологии специалисты в области биологической безопасности постоянно разрабатывают и совершенствуют правила и приемы лабораторной и технологической работы, которые призваны обеспечить личную безопасность персонала при ее проведении, а также различные защитные приспособления, приборы и оборудование [1, 4, 5]. Следует особо отметить, что существующие в настоящее время правила и приемы лабораторной работы с патогенными микроорганизмами, защитные устройства, режимные и технические меры, определенный уровень автоматизации в микробиологических лабораториях в значительной мере обеспечивают предотвращение случаев лабораторного заражения, но полностью исключить риск его они не могут. На это указывают периодически возникающие случаи заболевания вследствие заражения при лабораторной работе [1, 2, 7].

Обеспечение безопасной работы с патогенными микроорганизмами в лаборатории включает два основных фактора биологической безопасности: «технический» и «человеческий» [1, 7, 8]. В практике работы микробиологических лабораторий можно выделить несколько процедур (посевы больших объемов культуры микроорганизмов, центрифугирование, высушивание, дезинтеграция), когда технический и человеческий факторы тесно переплетаются и от того, как они функционируют, зависит безопасность персонала и окружающей среды.

Человек является основным звеном в работе с микроорганизмами независимо от степени их опасности. Правильность действий и поведения в той или иной ситуации, в комплексе мер, обеспечивающих безопасность, обуславливается уровнем владения профессиональными навыками и приемами, знанием возможных источников и механизмов заражения (или создания опасности заражения для окружающих), состоянием психики, здоровья в целом [1]. Однако необходимо учитывать и возрастающее инженерно-техническое обеспечение вредных и опасных работ в соответствии с современными требованиями биологической безопасности [1, 3, 9–11].

К техническому фактору биологической безопасности можно отнести барьерные защитные инженерные системы, обеспечивающие поддержание нормальных безопасных условий труда сотрудников в микробиологических лабораториях различных уровней безопасности, от первого до четвертого по международной классификации (BSL 1-4) [1, 3–5, 12–14], а также необходимый инструментарий и собственно технологическое оборудование.

Биотехнологические работы, связанные с микроорганизмами, включают в себя несколько этапов или циклов:

- ферментацию биологического материала;
- концентрирование материала с патогенными биологическими агентами (ПБА) при помощи систем и устройств;

- высушивание концентрированной субстанции с ПБА при помощи реагентов и установок;
- фасовку материала с ПБА в емкости;
- закладку емкостей на хранение.

Эти процедуры выполняют не только на биотехнологическом производстве, но и при приготовлении материала с ПБА для закладки на хранение в музейных и коллекционных отделах организаций или учреждений. Каждый этап сопровождается соответствующими требованиями биологической безопасности, соблюдение и проведение надлежащего контроля которых позволяет максимально снизить угрозы возникновения аварийных ситуаций или аварий.

С точки зрения биологической безопасности, проведение работ с ПБА с использованием аппаратов и систем биотехнологического назначения – наиболее опасный и аварийно значимый процесс. Во время этих работ могут возникать ситуации как техногенного, так и антропогенного характера. Все работы связаны с высококонцентрированными препаратами ПБА (ферментация, концентрирование, высушивание), возможным образованием аэрозоля микроорганизмов (концентрирование, высушивание, измельчение), а также наличием большого объема биомассы (ферментация, концентрирование).

Каждый этап биотехнологического процесса – это практически законченный цикл работы с ПБА, и для каждого из них определены конкретные требования биологической безопасности. Они относятся к помещениям и оборудованию, средствам индивидуальной защиты, обеззараживанию твердых и жидких отходов. Особое значение приобретает процесс допуска сотрудников к проведению работ в биотехнологическом блоке «заразных» помещений лаборатории.

Соответственно, все этапы работы с микроорганизмами для проведения биотехнологического процесса должны быть правильно оформлены, то есть иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о наличии условий для выполнения данного вида работ и соответствии нормативным документам и лицензию на право проведения работ.

Следуя положениям нормативных документов [9, 10], к работе с ПБА допускают специалистов не моложе 18 лет с высшим или средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным (например, технологическим) образованием после окончания соответствующих курсов специализации с освоением методов безопасной работы с ПБА. Привлекаемые сотрудники не должны иметь противопоказаний к лечению специфическими препаратами, а также к работе в средствах индивидуальной защиты. Инженерно-технический персонал структурного подразделения, осуществляющего деятельность с ПБА I–II групп, проходят специальную подготовку по биологической безопасности по месту работы в соответствии с должностными обязанностями [9, 10].

Инженерно-технический персонал, дезинфекторы и санитарки структурного подразделения, осуществляющего деятельность с использованием ПБА III–IV групп, должны проходить специальную подготовку по биологической безопасности по месту работы в соответствии с должностными обязанностями.

Допуск инженерно-технического персонала к обслуживанию оборудования лабораторий (отделов, отделений) при проведении работ с ПБА I–IV групп осуществляет руководи-

тель организации один раз в два года после проверки знаний по биологической безопасности. Разрешение на посещение лаборатории инженерно-техническому персоналу, не работающему постоянно в учреждении, выдает руководитель организации на основании запроса руководителя структурного подразделения. Посещение осуществляется после прекращения работы и проведения текущей дезинфекции в помещениях лаборатории, в сопровождении ответственного, назначенного сотрудника структурного подразделения, и регистрируется в журнале посещений подразделения [9, 10].

Возникает справедливый вопрос: кто лучше, качественней и безопасней проведет биотехнологический процесс – врач, биолог или инженер-технолог? На наш взгляд, лучше это сделает инженер-технолог. Естественно, что у него должны быть определенные теоретические и практические знания в области биологической безопасности и постоянный контакт во время проведения процесса со специалистами медико-биологического профиля.

Мы исходим из того, что в соответствии с нормативными документами инженерно-технический персонал лаборатории не может самостоятельно вести учет ПБА [9, 10, 15]. Технолог лучше справится с инженерно-техническим обеспечением биотехнологического процесса, а биолог или врач – непосредственно с микроорганизмами. Кроме того, специалисты с профессиональной подготовкой по медико-биологическому профилю более грамотно могут оценить последствия аварийной ситуации и/или аварии во время проведения работ с ПБА и принять грамотное обоснованное решение по их ликвидации.

В доступной нам литературе мы не встретили материалов, позволяющих говорить об обеспечении требований биологической безопасности при проведении биотехнологических работ комплексно. Поэтому целью настоящей работы является рассмотрение вопроса обеспечения и контроля соблюдения требований биологической безопасности при проведении биотехнологических процессов с большими массами, концентрациями микроорганизмов I–IV групп патогенности.

С точки зрения соблюдения требований биологической безопасности подготовка помещения, оборудования, приборов и аппаратов для проведения биотехнологических исследований является сложным процессом. Эти помещения относятся к изолированным и максимально изолированным лабораториям, или BSL 3–4 (уровень биологической безопасности) по международной классификации.

Биотехнологические процессы ведут с высококонцентрированным материалом. Все операции должны сопровождаться и поддерживаться соответствующими дезинфекционными мероприятиями, которые выполняют с использованием свежеприготовленных, проверенных рабочих дезрастворов. В обязательном порядке готовят аварийный запас дезсредств.

Все эти мероприятия протоколируют и актируют. Документы хранят в течение одного года.

Соответственно, все требования биологической безопасности при выполнении процедур с материалом, содержащим ПБА, на всех этапах биотехнологического процесса должны быть отражены в соответствующих разделах инструкций по проведению работ.

В биотехнологии, особенно если для получения биомассы используют патогенные микроорганизмы, процесс проводят,

максимально обезопасив исполнителя и окружающую среду от возможного попадания ПБА. Обычно это помещения не имеют оконных проемов, а если они есть, то располагаются во внутреннем периметре помещения лаборатории и выходят в коридор.

Ограждающие поверхности (пол, стены, потолок) должны быть покрыты герметизирующим составом, красителями, устойчивыми к моющим и дезинфицирующим растворам высокой концентрации. Это связано с тем, что эти процессы связаны с высококонцентрированным материалом, содержащим ПБА. Для того чтобы обеспечить надлежащее выполнение требований биологической безопасности при проведении этапов биотехнологического процесса, необходимо выполнить ряд условий.

Во-первых, желательно соединить все этапы биотехнологического процесса в единую цепочку. Например, внутреннюю емкость ферментера, установленного в помещении ферментационного зала (сепарация идет следующей стадией технологического процесса за ферментацией), с сепаратором, чтобы не было возможного попадания материала в окружающую среду. В этом случае под окружающей средой мы понимаем пространство вспомогательных, рабочих помещений и коридоров в лаборатории.

Во-вторых, необходимо определить типы рабочей и защитной одежды, в которой будут работать сотрудники. Обычно это первый тип противочумного костюма, дополненный противоголозом. Однако если процесс проводят в помещении максимально изолированной лаборатории, оборудованной системой подачи воздуха в средства индивидуальной защиты органов дыхания (СИЗ ОД) в виде изолирующего костюма, работающего под давлением, то сотрудники, привлекаемые к работам, должны пройти дополнительное обучение по работе в костюме, сдать зачет по знанию требований биологической безопасности и получить допуск к работам в СИЗ.

В-третьих, необходимо подготовить самих сотрудников. Они должны обладать определенными навыками работы с микроорганизмами, окончить соответствующие курсы повышения квалификации, пройти входной медицинский осмотр, получить профилактические прививки и после этого могут быть допущены к данным работам приказом руководителя, как это уже говорилось выше.

В-четвертых, все инженерные системы биологической безопасности должны быть подготовлены к работе, опробованы и аттестованы для выполнения работ с составлением актов и протоколов, которые представляются в комиссию по контролю соблюдения требований биологической безопасности.

Необходимо убедиться, что все помещения, предназначенные для проведения работ, соответствуют требованиям биологической безопасности. Желательно, чтобы это были отдельные блоки из помещений, соединенных между собой одним технологическим коридором или же между ними должны быть смонтированы передаточные шлюзы. Помещения должны быть герметичными, то есть между стенами, полом и потолком нет трещин, сколов и т.п. Герметичность должна быть достигнута и в области перекрытий.

Для оценки герметичности, особенно в помещениях для концентрирования, высушивания и измельчения, проводят оценку герметичности путем налива жидкости на пол с контролем протечки. Если протечка обнаруживается, то это

место герметизируют дополнительно. Особое внимание необходимо уделить стеновым проходкам, межэтажным гильзам и сливным трапам. Они должны выступать над поверхностью на 2–3 см, и места соприкосновения со строительной конструкцией должны быть тщательно загерметизированы. Это же относится и к проходкам электрических сетей, слаботочной системы информационной и аварийной сигнализации. Помещения должны находиться на круглосуточной охране. В рабочих комнатах предусматривается естественное или достаточное искусственное освещение.

Режим вентиляции рабочих помещений – принудительный механический с постоянным разрежением до –250 Па, достаточным обменом воздуха до 10 раз в час и очисткой подаваемого и выбрасываемого воздуха на высокоэффективных фильтрах очистки воздуха класса не ниже H14. Фильтры, вентиляционные агрегаты, вентиляционные камеры подлежат обязательной проверке с составлением актов готовности к эксплуатации.

Проверяют системы обеззараживания жидких и твердых отходов (паровые стерилизаторы и станции тепловой обработки стоков) на их техническую и защитную эффективность. Все процессы документируют и оформляют в виде протоколов.

Необходимо обратить особое внимание на защитную одежду и средства индивидуальной защиты органов дыхания, в которых будут проводить процесс. Одежда должна соответствовать уровню биологической безопасности, максимально защищая покровы тела и слизистые от ПБА. Идеально для этих целей подходят шланговые средства индивидуальной защиты, работающие под давлением. Однако не каждая организация имеет достаточный запас таких СИЗ и обученный персонал для работы в них. Также отсутствуют (или их недостаточно) места для хранения и проверки СИЗ. Кроме того, необходимо помнить, что такие СИЗ имеют определенный срок эксплуатации и после этого срока должны быть уничтожены.

Для работы на биотехнологическом оборудовании используют опасные для человека химические реактивы (концентрированные кислоты и щелочи, всевозможные растворители). При неправильном хранении или использовании может произойти химическое отравление, пожар или взрыв, которые являются нарушением общей техники безопасности и требований биологической безопасности. Для ликвидации последствий аварийной ситуации или аварии применяют следующие меры по ее ликвидации:

- хранят химические реактивы в специальных отведенных для них помещениях;
- работают с ними под вытяжкой в хорошо вентилированном помещении;
- соблюдают инструкции по безопасности.

При возникновении пожара возможны различные ситуации, которые являются нарушением общей техники безопасности и требований биологической безопасности. В момент возникновения пожара нарушается контролирование биотехнологического процесса в целом. Данную ситуацию можно отнести к внешним угрозам, так как в ее возникновении сотрудники лаборатории являются пострадавшими. Для ликвидации последствий применяют следующие меры:

- устанавливают аварийное освещение и указывают пути эвакуации;

- для ликвидации легких возгораний в помещения используют первичные средства тушения огня (огнетушители);
- персонал обучают технике пожарной безопасности.

Самая основная, на наш взгляд, категория угроз в биотехнологическом процессе (так как при несоблюдении общей техники безопасности и требований биологической безопасности данный фактор ведет ко всем основным и биологическим рискам):

- при работе с сосудами, работающими под давлением, может произойти взрыв;
- несоблюдение правил пожарной безопасности при работе с легковоспламеняющимися жидкостями и электрическими нагревательными приборами может привести к ожогам или пожару;
- неправильное обращение с приборами, подключенными к электросети, может привести к поражению электрическим током или возникновению пожара из-за короткого замыкания;
- неправильная работа с микроорганизмом может привести к заболеванию или смерти человека;
- работая со стеклянной посудой и острыми приборами, можно порезаться;
- неправильная работа с химическими реактивами может привести к химическому отравлению, ожогам, пожару, взрыву;
- при неправильной работе с жидкими газами или сильно замороженными предметами возможно обморожение.

Для ликвидации последствий аварийной ситуации или аварии применяют следующие меры:

- необходимо постоянно поддерживать высокий уровень подготовки квалифицированных специалистов, как микробиологов и биотехнологов, так и инженерно-технического персонала, обеспечивающего работу общих корпусных систем;
- обеспечивать регулярный пересмотр нормативно-методической документации (инструкции, регламенты), вводя в нее новые, прогрессивные методики и приемы безопасной работы;
- регулярное проведение инструктажей по общей, пожарной, электрической и биологической безопасности;
- регулярное проведение тренировочных занятий по ликвидации последствий аварий и аварийных ситуаций, которые могут возникнуть во время проведения работ на этапах биотехнологического процесса, аппаратах, системах энергоснабжения и инженерных системах биологической безопасности;
- соблюдение принципа «парности» при проведении всех штатных работ в биотехнологическом процессе;
- регулярная оценка работоспособности аппаратов и систем, внедрение новых лабораторных и биотехнологических методик и процедур, проведение автоматизации биотехнологического процесса.

Специфика производства микробиологической и биотехнологической продукции требует строгого соблюдения положений и требований нормативно-методических документов, устанавливающих санитарно-эпидемиологические требования, в том числе критерии безопасности, на всех этапах технологического процесса, включая контроль продукции.

Используемые на производстве технологические процессы, а также манипуляции с сырьем, материалами, реактивами, субстратами, оборудованием, производственными штаммами микроорганизмов, упаковочными материалами должны гарантированно обеспечивать безопасность для персонала и окружающей среды.

Все производственные процессы должны быть регламентированы и документированы и обеспечивать неизменность производства продукции, отвечающей параметрам качества и требованиям безопасности.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Дроздов СГ, Гарин НС, Джиндоян ЛС, Тарасенко ВМ. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина; 1987, 256 с.
2. Шкуров АА, Тюрин ЕА. Случай внутрилабораторного заражения сапом. Материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня основания нижегородскому НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной «Научное обоснование противозидемической защиты населения». Н. Новгород. 2009, с. 111-112.
3. Тюрин ЕА. Обеспечение требований биологической безопасности на биологически опасном объекте. Биозащита и биобезопасность. 2013;2:34-42.
4. Дмитриева ВА, Воронин АМ, Дмитриев ВВ, Доброхотский ОН, Жариков ГА, Коломбет ЛВ, и др. Учебное пособие по биобезопасности. Тула: Изд-во ТулГУ; 2013, 500 с.
5. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd Edition. Canada. 2004, 113 p.
6. Pike M. Laboratory-associated infectious: summary and analysis of 3921 cases. Health Lab Sci. 1976;13(2):105-14.
7. Тюрин ЕА. Индивидуальные и коллективные факторы биобезопасности. Жизнь без опасностей. 2010;V(4):148-53.
8. Тюрин ЕА. Факторы биологической безопасности. Биозащита и биобезопасность. 2010;I(3(4)):34-9.
9. «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.3118-13. М.: Госсанэпиднадзор России; 2013, 195 с.
10. «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08. Санитарно-эпидемиологические правила. М.: Роспотребнадзор; 2008, 76 с.
11. Найденов АЯ. Безопасность работ в микробиологических лабораториях. Защитная эффективность инженерных систем безопасности. М.: ДеЛи плюс; 2013, 224 с.
12. Боровик РВ, Дмитриев ГА, Коломбет ЛВ, Победимская ДД, Ремнев ЮВ, Тюрин ЕА, Фёдоров НА. Основы биологической безопасности: принципы и практика. Учебно-методическое пособие. М.: «Медицина для вас»; 2008, 303 с.
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for

Disease Control and Prevention National Institutes of Health HHS Publication No (CDC) 21-1112 Revised December 2009, 360 p.

14. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd Edition. Canada. 2004, 113 p.

15. «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». СП 1.2.036-96. Санитарные правила. М., 1995.

References

1. Drozdov SG, Garin NS, Dzhindoyan LS, Tarasenko VM. Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1987, 256 p. (In Russian).
2. Shkurov AA, Tyurin EA. Sluchai vnutilaboratornogo zarazheniya sapom. Materials of the anniversary scientific and practical conference "Scientific justification of anti-epidemic protection of the population". N. Novgorod. 2009, pp. 111-112. (In Russian).
3. Tiurin YeA. The securing of requirements of biological safety on biologically dangerous objects. Biozashchita i biobezopasnost. 2013;2:34-42. (In Russian).
4. Dmitrieva VA, Voronin AM, Dmitriev VV, Dobrokhotskii ON, Zharikov GA, Kolombet LV, et al. Uchebnoe posobie po biobezopasnosti. Tula, 2013, 500 p. (In Russian).
5. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd Edition. Canada. 2004, 113 p.
6. Pike M. Laboratory-associated infectious: summary and analysis of 3921 cases. Health Lab Sci. 1976;13(2):105-14.
7. Tyurin EA. Individual'nye i kollektivnye faktory biobezopasnosti. Zhizn' bez opasnostei. 2010;V(4):148-53. (In Russian).
8. Tyurin EA. Faktory biologicheskoi bezopasnosti. Biozashchita i biobezopasnost. 2010;I(3(4)):34-9. (In Russian).
9. "The safety of work with microorganisms of I–II groups of pathogenicity". Sanitary and epidemiological rules. SP 1.3.3118-13. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2013, 195 p. (In Russian).
10. "Safety of work with microorganisms of groups III–IV of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08. Санитарно-эпидемиологические правила. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2008, 76 p. (In Russian).
11. Naidenov AY. Bezopasnost' rabot v mikrobiologicheskikh laboratoriyakh. Zashchitnaya effektivnost' inzhenernykh sistem bezopasnosti. Moscow: "DeLi plus" Publ.; 2013, 224 p. (In Russian).
12. Borovik RV, Dmitriev GA, Kolombet LV, Pobedimskaya DD, Remnev YuV, Tyurin EA, Fedorov NA. Osnovy biologicheskoi bezopasnosti: printsipy i praktika. Moscow: "Meditsina dlya vas" Publ.; 2008, 303 p. (In Russian).
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112 Revised December 2009, 360 p.
14. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd Edition. Canada. 2004, 113 p.
15. "The procedure for accounting, storage, transfer and transportation of microorganisms of groups I–IV of pathogenicity". SP 1.2.036-96. Sanitary regulations. Moscow, 1995. (In Russian).

Информация об авторе:

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

Information about author:

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

29 октября 2020 года безвременно ушел из жизни член редколлегии журнала «Бактериология» Владимир Ашотович Давидянц

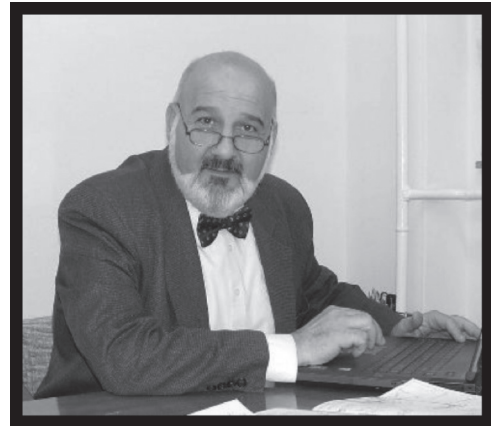
В.А.Давидянц родился 16 февраля 1953 г. в Баку, Азербайджанская ССР. После окончания учебы на санитарно-гигиеническом факультете Ереванского государственного медицинского института в 1976 г. он начинает свою многогранную трудовую деятельность. Практическая работа на санитарно-эпидемиологической станции г. Еревана, научно-преподавательская – в НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б.Алексяна Минздрава Армении, в Ереванском государственном институте усовершенствования врачей Минздрава СССР, где он заведовал кафедрой эпидемиологии и медицинской информатики. Параллельно в 1992–1996 гг. он был директором созданного им Института общественного здоровья Минздрава Республики Армения. В 1992 г. В.А.Давидянц основал Армянскую ассоциацию общественного здоровья и до последних дней жизни занимал должность ее президента. С 1996 г. Владимир Ашотович занимал различные должности в структурах здравоохранения Республики Армения (основатель и директор Информационно-аналитического центра, заместитель министра здравоохранения, главный государственный санитарный врач, заместитель директора Национального института здравоохранения, главный специалист Минздрава по паразитарным и тропическим болезням).

С 2013 г. по настоящее время профессор Давидянц работал в Программе Департамента обороны США по снижению биологических угроз (DTRA CBEP) в Армении в качестве научного консультанта, а затем заместителем директора по профессионально-техническим вопросам в компании JACOBS/CH2M HILL Inc., внося значительный вклад в непрерывное медицинское образование и научные исследования в области биомедицины.

С 2016 г. профессор Давидянц также являлся членом Рабочей группы по мониторингу и оценке Стратегической технической консультативной группы (СТКГ) по забытым тропическим болезням (ЗТБ) в штаб-квартире ВОЗ.

Благодаря усилиям В.А.Давидянца, включая научную работу, в Армении были реализованы программы йодирования соли, элиминации полиомиелита и малярии.

Давидянц был ведущим экспертом проектов международных организаций (ВОЗ, Агентства международного развития США и Канады, Европейского Союза, Центра по контролю и профилактике заболеваний США, Международного научно-технического центра, Программы биотехнологии США, Программы исследования тропических заболеваний и др.).



Он проводил исследования в области инфекционных заболеваний, паразитологии и эпидемиологии оппортунистических заболеваний.

Владимир Ашотович Давидянц – автор более 300 научных работ, в том числе 9 руководств, 7 монографий, учебных пособий, атласов и т.д., которые эффективно интегрированы в научно-образовательную систему Республики Армения с целью развития системы здравоохранения.

Неоценима роль профессора Давидянца как научного консультанта и руководителя научных работ, благодаря ему многие студенты проложили себе путь в науку, защищено около двух десятков диссертаций. Многие ученики Владимира Ашотовича в настоящее время вносят весомый вклад в борьбу с коронавирусом COVID-19.

В.А.Давидянц участвовал в работе редколлегий ведущих научных журналов: «Медицинская паразитология и паразитарные заболевания», «Sino», «Бактериология».

Работы профессора Давидянца оценены многочисленными наградами и званиями государственных и общественных организаций: «Награды признательности» от министров здравоохранения Республики Армения (1998, 2002, 2005, 2012, 2016), «Награда за выдающийся достижения» от премьер-министра Республики Армения (2001), почетные медали им. Р.Вирхова (2003), им. Рентгена (2005), им. Р.Коха (2014), Награда от Армянской ассоциации организаторов здравоохранения (2008), «Награда признательности» от министра здравоохранения Республики Узбекистан (2017) и многие другие.

Светлая память о Владимире Ашотовиче Давидянце останется в сердцах его друзей и коллег.

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