

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2021 • ТОМ 6 • №4

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

Адъяасүрэн 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)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	Т.В.Припутневич, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	А.Ракин (Германия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
М.Косой, к.б.н. (США)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)	А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)

Учредитель

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

Этот номер журнала издан при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости» в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, соглашение №075-15-2019-1671.

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

117149, Москва, Азовская ул., д. 6, корпус 3

Подписано в печать 27.12.2021 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

- Развитие проблемы антибиотикорезистентности в период пандемии COVID-19:
динамика процесса и направления научных исследований **5**

Экспериментальные статьи

- Экспрессия малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* при культивировании
в стрессовых условиях *in vitro* и моделировании туберкулеза у мышей
Н.В.Колупаева, М.В.Фурсов, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, Т.И.Комбарова,
Е.А.Ганина, В.Д.Потапов, И.А.Дятлов **9**
- Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза
В.И.Дятлова **16**
- Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов
первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*
М.А.Шкуратова, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, А.К.Сурин, Л.В.Коломбет, В.В.Фирстова **30**
- Безопасность применения бруцеллезной иммунопотенцированной вакцины
для выявления скрытых форм бруцеллеза у животных
Е.М.Тё, И.Х.Маматкулов **39**
- Распространенность гименолепидоза в разрезе районов Самаркандской области
Л.Б.Махмудова **44**

Обзорные статьи

- Современное состояние разработки терапевтических препаратов
для нейтрализации коронавируса SARS-CoV-2
В.В.Фирстова, Л.В.Коломбет, И.Г.Шемякин **48**
- Серодиагностика эпидемически значимых для Российской Федерации инфекционных заболеваний
А.А.Горбатов, П.В.Соловьев, Е.В.Баранова, С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов **56**
- Питательные среды для выявления и культивирования клостридий
Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, И.С.Косилова, М.В.Храмов, А.П.Шепелин **62**
- К вопросу об определении вирулентности штаммов чумного микроба *in vitro*
Т.П.Шмелькова, Е.В.Сазанова, Т.А.Малюкова **70**
- Перспективность сочетания различных детекционных технологий для создания индикации
целевых ПБА-тест-систем, выявляющих патогены с максимальными показателями экспрессности,
автономности, чувствительности и специфичности
С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов **79**
- Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования
А.Е.Курилова, А.Ю.Лебедева, А.Г.Богун **84**

Памяти коллеги

- Меджидов Магомед Меджидович **94**
- Правила оформления статей (основные положения) **96**

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

- Development of the problem of antibiotic resistance during the COVID-19 pandemic:
dynamics of the process and directions of scientific research 5

Experimental Articles

- Expression of *Mycobacterium tuberculosis* small noncoding RNA under stressful conditions *in vitro*
and during tuberculosis infection in mice
N.V.Kolupaeva, M.V.Fursov, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, T.I.Kombarova,
E.A.Ganina, V.D.Potapov, I.A.Dyatlov 9
- Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis
V.I.Dyatlova 16
- Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin
units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*
M.A.Shkuratova, M.A.Maryin, M.M.Rogozin, A.K.Surin, L.V.Kolombet, V.V.Firstova 30
- Safety of brucellosis immunopotentiated vaccine administration to detect latent forms of brucellosis in animals
E.M.Tyo, I.Kh.Mamatkulov 39
- The prevalence of hymenolepidosis in the areas of the Samarkand region
L.B.Makhmudova 44

Review Articles

- Current state of development of therapeutic preparations for neutralizing the SARS-CoV-2 coronavirus
V.V.Firstova, L.V.Colombet, I.G.Shemyakin 48
- Serodiagnostics of infectious diseases epidemically significant for the Russian Federation
A.A.Gorbatov, P.V.Soloviev, E.V.Baranova, S.G.Ignatov, S.F.Biketov 56
- Nutrient media for detection and cultivation of clostridia
L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, I.S.Kosilova, M.V.Khramov, A.P.Shepelin 62
- Concerning determination of virulent properties of plague microbe *in vitro*
T.P.Shmelkova, E.V.Sazanova, T.A.Malyukova 70
- The perspective of a combination of various detection technologies for creating an indication
of target PBA test systems that detect pathogens with maximum rates of rapidity, autonomy, sensitivity and specificity
S.G.Ignatov, S.F.Biketov 79
- Accumulation of mutations in the genomes of microorganisms during long-term storage and cultivation
A.E.Kurilova, A.Yu.Lebedeva, A.G.Bogun 84

Obituary

- Magomed M. Medjidov 94
- Instructions for Authors 96

Развитие проблемы антибиотикорезистентности в период пандемии COVID-19: динамика процесса и направления научных исследований

Во втором номере журнала за 2020 г. мы обращались к проблеме применения экспресс-методов выявления антибиотикорезистентности в условиях эпидемии коронавирусной инфекции, коснувшись и ситуации с динамикой резистентности. К настоящему времени накопилось достаточно большое количество информации о развитии проблемы лекарственной устойчивости при массовом применении антибиотиков для лечения осложнений при новой коронавирусной инфекции, связанной с бактериальными пневмониями. В связи с этим научные направления исследований, связанные с преодолением резистентности, приобрели особо значение. В настоящем сообщении мы приводим аналитические материалы о сегодняшней ситуации с бактериальной резистентностью и возможные пути решения проблемы при интенсивном научном сопровождении данной ситуации.



В условиях пандемии COVID-19 во всех странах мира значение резистентности существенно возросло в связи с массовым, не всегда оправданным применением антибиотиков у пациентов с коронавирусной инфекцией. Так, в мире 74,6% (95% ДИ 68,3–80,0%) пациентов с COVID-19 получали антибиотики (7469 исследований); рост назначений связан с увеличением возраста пациентов (OR 1,45 на 10 лет, 95% ДИ 1,18–1,77), а также с увеличением доли пациентов, которым требовалась искусственная вентиляция легких (OR 1,33 на 10% увеличения, 95% ДИ 1,15–1,54). В Великобритании, согласно руководству Национального института охраны здоровья и совершенствования медицинской помощи (NICE), для лечения тяжелой пневмонии вне зависимости от ее этиологии пациенты получают антибиотики широкого спектра действия. Вызывают беспокойство клинические данные, свидетельствующие о том, что нерациональное эмпирическое применение антибиотиков широкого спектра действия может быть ассоциировано с более высокой летальностью, по крайней мере в случае сепсиса.

По-видимому, в стационарах происходит распространение как SARS-CoV-2, так и бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, что приводит к увеличению числа летальных исходов вследствие ограниченности арсенала антибиотиков для лечения внутрибольничных инфекций. Это также может поставить под угрозу лечение пациентов после операций, трансплантаций или химиотерапии. Увеличение содержания антимикробных препаратов в сточных водах больниц может изменить их концентрацию в окружающей среде. Это, в свою очередь, приведет к повышению вероятности распространения антибиотикорезистентных микроорганизмов у животных, а также в сельском хозяйстве и естественных экосистемах. Широкое использование дезинфицирующих средств в качестве мер защиты от SARS-CoV-2 может способствовать развитию устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, например за счет эффлюксных белков-транспортеров.

Обращаясь к данным литературы по этому вопросу, следует отметить, что инфекции бактериальной природы нечасто осложняют течение COVID-19. Так, в мета-анализе 24 исследований, включавших 3338 пациентов, частота бактериальной ко-инфекции на момент обращения за медицинской помощью составила 3,5% (95% ДИ 0,4–6,7%); вторичные бактериальные инфекции осложняли течение COVID-19 у 14,3% пациентов (95% ДИ 9,6–18,9%); в целом доля пациентов с бактериальными инфекциями составила 6,9% (95% ДИ 4,3–9,5%); бактериальные инфекции чаще регистрировались у пациентов с тяжелым течением COVID-19 (8,1%, 95% ДИ 2,3–13,8%). По данным другого мета-анализа 31 исследования, бактериальная ко-инфекция выявлена в 8,6% (95% ДИ 4,7–15,2%). Согласно результатам мета-анализа, включавшего 30 исследований и 3834 госпитализированных больных с COVID-19, подтверждение вторичной бактериальной инфекции было получено у 7 и 15% пациентов, находившихся в терапевтических отделениях и отделениях реанимации и интенсивной терапии соответственно. Однако по результатам патологоанатомических исследований 32–50% пациентов, умерших от COVID-19, имели бактериальную суперинфекцию легких.

Наиболее серьезную проблему представляют штаммы, не поддающиеся лечению рекомендованными лекарственными препаратами. Наблюдается быстрый рост числа микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе микроорганизмов группы ESKAPE: *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра; *Enterobacterales*, устойчивых к карбапенемам и продуцирующих металло-β-лактамазы Нью-Дели; *Acinetobacter baumannii*; устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus*, а также пан-эхинокандин-резистентные *Candida glabrata* и мульти-триазол-устойчивый *Aspergillus fumigatus*, присоединение которых к ковидной пневмонии повышает вероятность неблагоприятного исхода заболевания.

В качестве возбудителей ко-инфекций выделяли *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *A. baumannii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida* и *Aspergillus* sp., а также различные вирусы. Основные жизнеугрожающие микозы у больных COVID-19 – инвазивный аспергиллез (COVID-ИА) и инвазивный кандидоз (COVID-ИК). Другие микозы (мукомикоз и пр.) встречаются значительно реже. COVID-ИА и COVID-ИК возникают преимущественно у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Риск развития COVID-ИК у больных в ОРИТ без специфических факторов риска (например, выраженной нейтропении) невысок.

В Ухане, Китай, Li et al. продемонстрировали, что у госпитализированных пациентов с COVID-19 с приобретенными вторичными бактериальными инфекциями наиболее распространенными патогенами были *A. baumannii* (35,8%), за которым следовали *K. pneumoniae* (30,8%) и *S. maltophilia* (6,3%); уровень резистентности к карбапенемам для *A. baumannii* и *K. pneumoniae* составлял 91,2 и 75,5% соответственно.

Отягощающими обстоятельствами присоединения полирезистентной вторичной инфекции является необходимость искусственной вентиляции легких: так, Pickens (США) проанализировал 386 образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) от 179 таких пациентов с поражениями SARS-CoV-2. Бактериальная вторичная инфекция в течение 48 ч после интубации выявлялась у 21% пациентов. У 44,4% развился по крайней мере один эпизод вентилятор-ассоциированной пневмонии (ВАП); 20,8% начальных ВАП были вызваны полирезистентными патогенами. При этом увеличение доли резистентных микроорганизмов коррелировала с продолжительностью госпитализации.

Ретроспективное исследование показало, что частота колонизации устойчивых к карбапенемам *Enterobacterales* (CRE) увеличилась с 6,7% в 2019 г. до 50% в марте–апреле 2020 г. В РФ доля карбапенемрезистентных штаммов *K. pneumoniae* у пациентов с COVID-19 с тяжелыми пневмониями возросла до 72,2%.

Лечение инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами в эпоху COVID-19, связано как с поиском новых антибактериальных препаратов, так и с созданием препаратов, альтернативных антибиотикам. Особенно это актуально в отношении грамотрицательных бактерий, т.к. они составляют 50% антибиотикоустойчивых угроз из более 2,8 млн инфекций, резистентных к антибиотикам ежегодно регистрируемых в США (CDC).

На сегодняшний день в мире 13 антибиотиков проходят испытания 3-й фазы, семь из них оцениваются как варианты для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными патогенными микроорганизмами: ингибиторы β-лактамазы (цефепим/энментабактам, цефепим/таниборбактам, сульбактам/дурлобактам); карбапенемы (сулопенем, тебипенем); новые ингибиторы бактериальной топоизомеразы (гепотидацин, золифлодацин).

К альтернативным препаратам, имеющим множество достоинств, но не лишенным недостатков, относятся бактериофаги. Доступно несколько коммерческих фаговых препаратов, которые можно использовать против ESKAPE-патогенов. Stafal (Bohemia Pharmaceuticals, Словакия) – антистафилококковый фаговый препарат, Sextaphage (Microgen, ImBio, Нижний Новгород, Россия) – коктейль против *P. aeruginosa* и *E. coli*, а Pyophage (Грузинский институт бактериофагов, микробиологии и вирусологии им. Элиава) содержит бактериофаги, специфически устраняющие возбудителей гнойно-воспалительных и кишечных заболеваний. PhagoBioDerm – полимерная повязка, пропитанная коктейлем фагов, ципрофлоксацином и другими активными ингредиентами, обеспечивает длительное высвобождение фагов для лечения язв или раневых инфекций, вызванных *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

В нашем журнале мы неоднократно публиковали материалы о развитии в ГНЦ ПМБ исследований по борьбе с резистентностью возбудителей инфекций. В рамках Центра геномных исследований разработан ряд препаратов биологического происхождения для этих целей. Проведены генноинженерные разработки по получению рекомбинантных молекул бактериофагов – эндолизинов, разрушающих клеточную стенку бактерий, и деполимераз, разрушающих биопленки, которые в сочетании с антибиотиками позволяют значительно повысить терапевтический эффект. Нарботаны образцы нативного бактериоцина – мундтицина Р436 широкого спектра действия. Полученные образцы препаратов всесторонне изучены на биологических моделях и имеют выраженную клиническую перспективу, так как резистентность к ним у патогенов развивается медленно и не всегда,

Новым инструментом достижения элиминации только специфических видов бактерий с сохранением остальной части микробиоты могут служить видоспецифические программируемые RNA-содержащие антибиотики, которые открывают возможность создания нового поколения персонализированных терапевтических препаратов, основанных на редактировании микробиома. Они могут быть синтезированы химически и запрограммированы на поражение конкретных видов бактерий. Наиболее перспективными направлениями на настоящий момент представляется использование малых некодирующих RNA (srRNA), играющих важную роль в регуляции трансляции у бактерий, а также систем CRISPR-Cas, выполняющих роль иммунной системы у бактерий и обеспечивающих защиту от мобильных генетических элементов. CRISPR-Cas основана на специфичном узнавании чужеродной DNA или RNA за счет спаривания с короткими (32–35 нуклеотидов) гидовыми RNA, генерируемыми CRISPR-массивом, с последующим разрезанием целевой последовательности нуклеазой, кодируемой генами *cas*. Высокая специфичность систем CRISPR-Cas и возможность их нацеливания на гены антибиотикорезистентности обосновывают их использование в качестве новых антимикробных препаратов, позволяющих атаковать непосредственно гены антибиотикорезистентности и нежелательные патогенные бактерии, не затрагивая других представителей микробиома. Гидовые RNA или CRISPR-RNA (crRNA), нацеленные на генетические детерминанты факторов вирулентности, антибиотикорезистентности или на существенные хромосомные гены патогенных бактерий, разрабатываются на базе ФБУН ГНЦ ПМБ для представителей группы ESKAPE.

Кроме того, CRISPR-Cas-системы могут использоваться для высокочувствительной диагностики – выявления генов резистентности. В настоящее время в мире ведутся разработки тест-систем на основе сочетания CRISPR-Cas и аптамеров. Аптамеры – фрагменты ДНК, специфичные к мишеням и отобранные методами высокопроизводительного скрининга *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов, – отличаются тем, что чувствительность при их применении превышает методы детекции на основе антител, они не зависят от иммуногенности мишени, хорошо хранятся. В ГНЦ ПМБ были разработаны аптамеры для выявления *E. coli* O157:H7, ботулотоксина и шига-токсина, поэтому владение технологией получения молекул данной группы позволяет рассчитывать на их использование в борьбе с антибиотикорезистентностью не только в диагностическом, но и в лечебном плане.

Анализируя сегодняшнее состояние проблемы, следует выделить основные направления в решении проблемы лекарственной устойчивости научными методами.

В России отмечается крайне недостаточное количество финансируемых научных программ и грантов, касающихся решения проблемы резистентности патогенов. Соответствующие тематики необходимо включать во все финансируемые программы по фундаментальным и прикладным исследованиям в области инфекционной патологии.

Исследования по мониторингу распространения резистентных штаммов в стране или даже распространения детерминант резистентности, в конечном счете, не дают ощутимого результата для решения проблемы. Нет обобщающих результатов для определения страте-

гии борьбы. Следует централизовать исследования генотипа и фенотипа клинических штаммов в рамках создания «Национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов». Это позволит целенаправленно создавать диагностические наборы с учетом циркулирующих в данном регионе устойчивых штаммов.

Отсутствуют экспресс-тест-системы отечественного производства для быстрого определения у выделенных патогенов спектра резистентности и принятия решения о терапии. Такие импортные системы существуют только в крупных клинических лабораториях и только в крупных городах. Необходимы вложения в разработки и организацию массовых производств быстрых тестов для выявления резистентности по минимальной подавляющей концентрации антибиотиков и определения генов резистентности.

Разработки новых антибиотиков практически не ведутся, а выпускаются в основном дженерики, новые препараты только импортного производства. Необходимо участие промышленных партнеров в целевом финансировании разработок, испытаний и внедрении в производство инновационных антимикробных препаратов, основанных на новых, отличных от антибиотиков принципов действия.

Решение проблемы резистентности лежит в сфере проведения интенсивных фундаментальных исследований в области изучения на молекулярно-генетическом уровне взаимоотношений патоген–хозяин, исследования значения стрессовых реакций микробных популяций в развитии резистентности, выяснения механизмов образования дормантных форм патогенов, механизмов формирования биопленок. Эти научные данные должны являться основой для создания целевых препаратов, направленных на определенные звенья метаболизма патогенов с использованием методов обратной генетики или комбинаторной химии, а также генетического редактирования.

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

Экспрессия малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* при культивировании в стрессовых условиях *in vitro* и моделировании туберкулеза у мышей

Н.В.Колупаева, М.В.Фурсов, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, Т.И.Комбарова,
Е.А.Ганина, В.Д.Потапов, И.А.Дятлов

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

Одной из самых опасных социально значимых инфекций населения многих стран является туберкулез. Известно, что диагностика и лечение туберкулезной инфекции затрудняется в результате изменчивости возбудителя *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе приобретения им множественной лекарственной устойчивости. В данной экспериментальной работе исследовали роль малых некодирующих РНК (мнРНК), которые, по современным данным, участвуют в регуляции генов вирулентности и адаптации к стрессам, которым подвергаются микобактерии в макроорганизме. Экспериментальные данные проведенного исследования *in vitro* подтверждают возможное участие некоторых мнРНК в адаптации клеток *M. tuberculosis* к условиям оксидативного и кислотного стрессов. В легких мышей линии BALB/c, инфицированных *M. tuberculosis* H37Rv, выявлено изменение уровней экспрессии нескольких генов мнРНК.
Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, малые некодирующие РНК, оксидативный стресс, кислотный стресс

Для цитирования: Колупаева Н.В., Фурсов М.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Комбарова Т.И., Ганина Е.А., Потапов В.Д., Дятлов И.А. Экспрессия малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* при культивировании в стрессовых условиях *in vitro* и моделировании туберкулеза у мышей. Бактериология. 2021; 6(4): 9–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-9-15

Expression of *Mycobacterium tuberculosis* small noncoding RNA under stressful conditions *in vitro* and during tuberculosis infection in mice

N.V.Kolupaeva, M.V.Fursov, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, T.I.Kombarova,
E.A.Ganina, V.D.Potapov, I.A.Dyatlov

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

Tuberculosis is one of the most dangerous socially significant infections worldwide. It is known that the diagnosis and treatment of tuberculosis infection are complicated by the variability of the pathogen of *Mycobacterium tuberculosis*, including the acquisition of multidrug resistance. In this study, we investigated the role of small non-coding RNAs (sRNAs), which, according to modern data, are involved in the regulation of virulence genes and adaptation to stresses that mycobacteria are exposed to in the host cells. Experimental data of the *in vitro* study confirm the possible participation of some sRNAs in the adaptation of *M. tuberculosis* cells to conditions of oxidative and acid stress. In the lungs of mice BALB/c infected with *M. tuberculosis* H37Rv a change in the expression levels of several ncRNAs genes was revealed.
Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, small non-coding RNA, oxidative stress, acid stress

For citation: Kolupaeva N.V., Fursov M.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Kombarova T.I., Ganina E.A., Potapov V.D., Dyatlov I.A. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* small noncoding RNA under stressful conditions *in vitro* and during tuberculosis infection in mice. Bacteriology. 2021; 6(4): 9–15. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-9-15

Для корреспонденции:

Колупаева Надежда Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и совершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: nadin.9830@mail.ru

Статья поступила 07.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of the Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: nadin.9830@mail.ru

The article was received 07.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

Туберкулез – инфекционное заболевание, которое является одной из ведущих причин смертности во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 г. в мире было зарегистрировано 9,9 млн новых заболеваний туберкулезом. В 2020 г. большинство случаев заболеваний были зарегистрированы в Юго-Восточной Азии (43%), Африке (25%) и Западной части Тихого океана (18%). Небольшой уровень заболеваемости туберкулезом был выявлен в Восточном Средиземноморье (8,3%), Северной и Южной Америке (3,0%) и Европе (2,3%) [1].

По данным исследований, патогенез возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* в значительной степени регулируется экспрессией малых некодирующих РНК (мнРНК) [2–4], которые, действуя на уровне транскрипции и трансляции, играют особую роль в регуляции экспрессии генов микобактерий [5]. К мнРНК относят транскрипты размером 50–400 нуклеотидов, которые не транслируются в белки и участвуют в регуляторных процессах. У туберкулезного микроба впервые были описаны 9 мнРНК в 2009 г., в настоящее время в геномах *M. tuberculosis* идентифицированы более 100 последовательностей, кодирующих мнРНК [6]. У большинства мнРНК туберкулезного микроба функции не изучены.

В ходе инфекционного туберкулезного процесса человека микобактерии туберкулеза фагоцитируются макрофагами (МФ) и подвергаются воздействию бактерицидных факторов в фагосомах. В структуре фагосомальных мембран МФ располагаются протонные АТФазы, вызывающие закисление внутренней среды фагосом, а также НАДФН-оксидазы, образующие активные формы кислорода, и NO-синтазы, генерирующие активные формы азота – радикалы NO* [7]. При попадании в фагосому клетки микобактерий подвергаются токсичному воздействию факторов макрофагов. Так, на мембране фагосом макрофагов организма-хозяина присутствуют НАДФН-оксидаза и NO-синтаза. Эти активные интермедиаты запускают процессы, ведущие к разрушению микобактериальных оболочек. При этом NO-радикал проявляет большую бактерицидную активность по сравнению с радикалом супероксида [3].

Однако клетки микобактерий способны длительное время сохраняться в фагосомах макрофагов [11]. Их адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды, возможно, обеспечивает синтез мнРНК, которые способны регулировать активность стресс-чувствительных генов микобактерий на посттранскрипционном уровне [8–10, 12, 13]. Таким образом, с помощью анализа изменения уровней их экспрессии возможно оценить влияние стрессовых и бактерицидных факторов на интенсивность синтеза адаптивных белков туберкулезного патогена.

Целью данного исследования было изучение изменения уровней экспрессии 13 генов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* штамма H37Rv в условиях, моделирующих стрессы, которым подвергаются клетки *M. tuberculosis* внутри фагосом млекопитающих, *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования

В исследовании использовали лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, полученный из Государственной кол-

лекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (В-3374). Культивирование клеток микобактерий проводили в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 Broth Base (Himedia, Мумбаи, Индия) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) («Биолот», Санкт-Петербург, Россия) и 0,05% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и на плотной питательной среде Middlebrook 7H11 Agar Base (Himedia, Мумбаи, Индия) с добавлением 10% сыворотки КРС. Посевы культивировали при температуре 37°C в течение 28 дней.

Моделирование оксидативного стресса *in vitro*

Микобактериальные клетки, выращенные в жидкой питательной среде 7H9 с 10% сыворотки КРС и 0,05% Tween 80 до оптической плотности (OD₆₀₀ = 1), центрифугировали при 5000 g при комнатной температуре в течение 20 мин, трижды отмывали фосфатным буфером и переносили в жидкую питательную среду 7H9 с 10% сыворотки КРС и 0,05% Tween 80 (pH 7,0) с добавлением H₂O₂ в конечных концентрациях 0,5, 1,0 и 5,0 мМ или с добавлением препарата PAPA NONOate (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), являющегося донором NO, в конечных концентрациях по NO 0,04, 0,4 и 4,0 мМ. В этих условия клетки *M. tuberculosis* H37Rv инкубировали при температуре 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в течение 40 мин. Клетки центрифугировали при 5000 g при температуре 4°C в течение 20 мин. Осадок использовали для выделения тотальной РНК. В качестве контроля клетки *M. tuberculosis* H37Rv культивировали в жидкой питательной среде 7H9 без добавления H₂O₂ или PAPA NONOate при тех же временных и температурных условиях. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Моделирование кислотного стресса *in vitro*

Клетки *M. tuberculosis* выращивали, осаждали, отмывали как описано выше. Затем их переносили в жидкую питательную среду 7H9 с 10% сыворотки КРС и 0,05% Tween 80 (pH 5,4). В этих условия клетки *M. tuberculosis* H37Rv инкубировали при температуре 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в течение 2, 15 и 24 ч. Клетки центрифугировали при 5000 g при температуре 4°C в течение 20 мин. Осадок использовали для выделения тотальной РНК. Контрольные клетки *M. tuberculosis* готовили как описано выше. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Лабораторные животные

Самки мышей линии BALB/c (n = 24) получены из питомника «Андреевка» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Московская область, Россия). В эксперимент брали животных в возрасте 14–15 нед. весом 22–25 г. Мышей содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями [11]. Животные имели свободный доступ к воде и корму («Лабораторкорм», Москва, Россия). Все эксперименты на животных проводились в полном соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях), а также требований Санитарных правил

1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней» и Ветеринарного протокола №ВП-2020/10 по биозтике ФБУН ГНЦ ПМБ.

Моделирование хронической туберкулезной инфекции у мышей линии BALB/c

Мышей линии BALB/c инфицировали внутрибрюшинно как описано ранее [12]: заражали суспензией клеток *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $1,3 \times 10^5$ КОЕ/животное, в объеме 0,2 мл. Ежедневно осуществляли контроль изменения веса и выживаемости животных. Для оценки патологического процесса на 45-е и 90-е сутки после заражения проводили анализ обсемененности и изменения гистологической картины паренхиматозных органов, как описано ранее [13]. Левое легкое инфицированных мышей замораживали в жидком азоте, затем переносили в микропробирку объемом 2 мл с циркониевыми бусами 0,1 мм (BioSpec, Бартлсвилл, Оклахома, США), добавляли 0,5 мл смеси фенол / гуанидин тиоцианат («Синтол», Москва, Россия) и гомогенизировали на дезинтеграторе Mini-Beatbeater (BioSpec, Бартлсвилл, Оклахома, США). Полученную суспензию использовали для выделения тотальной РНК.

Гистология паренхиматозных органов мышей

Легкие и селезенку мышей линии BALB/c фиксировали в 10%-м формалине («Био-ХИМ НН», Нижний Новгород, Россия), дегидратацию проводили в градиентных концентрациях этанола и бутанола, заключенный в парафин орган нарезали (5 мкм), используя Ultracut microtome («Райхерт-Юнг», Бенсхайм, Германия). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином/эозином, изучали и фотографировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i и Nikon DS-U2 (Nikon, Токио, Япония) при увеличениях $\times 4$ и $\times 20$.

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК

Выделение тотальной РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции с помощью набора «РНК-экстран» («Синтол», Москва, Россия). Для удаления следов ДНК пробу обрабатывали набором реагентов TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Отсутствие ДНК в пробах подтверждали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами на ген 16S рРНК *M. tuberculosis* и электрофореза в агарозном геле. Для получения первой цепи ДНК (кДНК) из тотальной РНК использовали набор реагентов MMLV RT kit («Евроген», Москва, Россия).

Анализ относительной экспрессии мнРНК в клетках *M. tuberculosis* в ответ на оксидативный и кислотный стрессы *in vitro*

Уровень представленности транскриптов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях оксидативного и кислотного стрессов оценивали при помощи ПЦР в реальном времени на приборе CFX96-touch (BioRad, Геркулес, Калифорния, США) с использованием реактивов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Москва, Россия) со специфическими праймерами на гены мнРНК. Программа амплификации: 95°C, 5 мин; [95°C, 20 с; 61°C, 20 с; 72°C, 30 с] \times 40 раз.

Реакцию проводили в трех повторностях. Полученные результаты нормировали относительно уровня транскрипции гена 16S рРНК и сравнивали с контрольным уровнем представленности транскриптов мнРНК в отсутствии стрессов методом $2\Delta\Delta Ct$ [14].

Анализ уровней экспрессии мнРНК в клетках *M. tuberculosis* в легких мышей линии BALB/c с хроническим туберкулезом

Представленность транскриптов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в легких мышей линии BALB/c с хроническим туберкулезом оценивали при помощи ПЦР в реальном времени, как описано выше. Полученные результаты нормировали относительно уровня транскрипции гена 16S рРНК методом Pfaffl [15].

Результаты и обсуждение

Транскрипционный ответ генов мнРНК *M. tuberculosis* на оксидативный стресс

Для изучения ответа клеток *M. tuberculosis* H37Rv на оксидативный стресс, вызванный присутствием H_2O_2 и NO, оценивали изменение уровней транскрипции 13 генов мнРНК (MTS0997, MTS1338, MTS2823, B11, ASdes, Mpr5, Mcr3, Mcr15, ASpks, Mcr5, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) по сравнению с таковым в контроле.

Показано, что в ответ на H_2O_2 во всех использованных концентрациях происходило увеличение уровней экспрессии 5 мнРНК (MTS0997, MTS1338, ASpks, Mpr5 и Mpr11). Для генов мнРНК B11 и ASdes зафиксировано увеличение экспрессии при концентрациях H_2O_2 0,5 и 1,0 мМ, а также для гена Mcr15 – при концентрациях H_2O_2 1 и 5 мМ. Экспрессия одного гена (Mcr7) снижалась в ответ на все использованные концентрации H_2O_2 . Гены MTS2823, Mpr5, Mcr3 и Mpr18 не изменяли своих уровней экспрессии в данных условиях (рис. 1).

В клетках *M. tuberculosis* H37Rv зафиксировано увеличение уровней представленности транскриптов мнРНК в ответ на присутствие ионов NO во всех использованных концентрациях (0,04, 0,4 и 4 мМ) для MTS1338 и снижение – для Mcr15, Mcr5, Mpr11 и Mpr18. При этом для Mpr5, ASpks и Mcr7 отмечено снижение экспрессии при концентрациях NO 0,4 и 4 мМ, для ASdes – при концентрации 0,04 мМ, а для MTS0997 – при концентрации 4 мМ. Представленность транскриптов MTS2823, B11 и Mcr3 не изменялась (рис. 2).

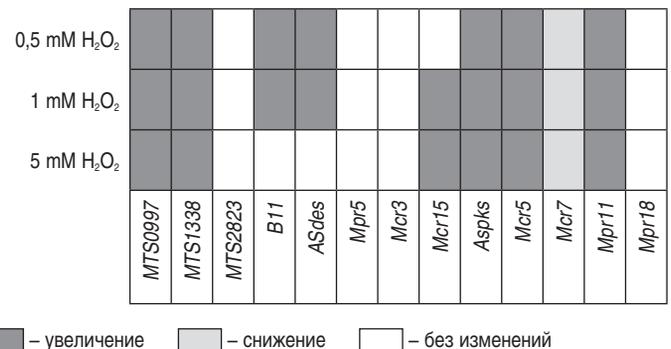


Рис. 1. Изменение уровней экспрессии генов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях оксидативного стресса (H_2O_2) в сравнении с контролем.

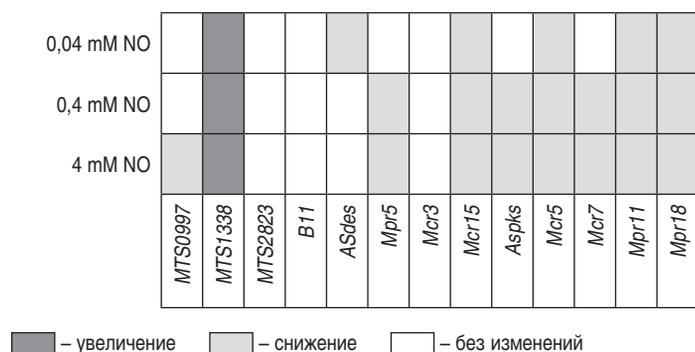


Рис. 2. Изменение уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях оксидативного стресса (NO) в сравнении с контролем.

Таким образом, получены данные, указывающие на увеличение уровней экспрессии гена мРНК *MTS1338* при действии H_2O_2 и NO во всех исследуемых концентрациях. В недавно опубликованной работе показано, что сверхэкспрессия мРНК *MTS1338* в клетках *M. tuberculosis* H37Rv приводила к снижению трансляционной активности и замедлению деления туберкулезных клеток [5]. Уменьшение уровня экспрессии гена *Mcr7* в условиях оксидативного стресса, возможно, указывает на участие этого гена в регуляции активности комплекса Tat, ответственного за трансмембранную секрецию ряда белков, что описано ранее [3, 6]. На основании полученных нами данных можно сделать вывод о подтверждении роли мРНК *MTS1338* и *Mcr7* в адаптации клеток *M. tuberculosis* к условиям окислительного стресса.

Транскрипционный ответ генов мРНК M. tuberculosis на кислотный стресс

Кислотный стресс моделировали с помощью культивирования клеток микобактерий в жидкой питательной среде со сниженными значениями pH (5,4). Эти условия имитируют подкисление среды в фагосоме, генерируемое ферментом протонной АТФазой, локализованной в мембранах фагосом МФ.

В ходе эксперимента отмечено увеличение экспрессии гена мРНК *Mpr5* в течение 24 ч, а гена *Mcr7* – в течение 2 ч воздействия кислотного стресса. Уменьшение экспрессии мРНК зафиксировано для *ASdes*, *Mpr11* и *Mpr18* в течение 2 ч и *ASpks* – в течение 24 ч. Отмечалось отсутствие изменений уровней экспрессии *MTS0997*, *MTS1338*, *MTS2823*, *B11*, *Mcr3*, *Mcr15* и *Mcr5* (рис. 3).

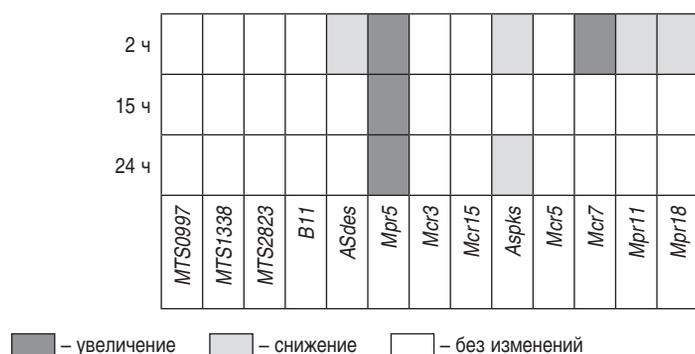


Рис. 3. Изменение уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях кислотного *in vitro* стресса по сравнению с контролем.

В отличие от полученных нами данных, ранее сообщалось, что экспрессия гена *ASpks* и *ASdes* увеличивалась в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при их поглощении МФ [6]. Это может указывать на роль *ASpks* и *ASdes* в адаптации клеток *M. tuberculosis* к другим стрессовым факторам, присутствующим в МФ.

Хроническая туберкулезная инфекция у мышей линии BALB/c, вызванная штаммом M. tuberculosis H37Rv

В качестве критериев оценки патологического туберкулезного процесса были использованы: изменение массы тела зараженных животных; изменение среднего веса легких и селезенки мышей; обсемененность микобактериями легких и селезенки мышей на 45-е и 90-е сутки после заражения; гистологическое исследование тканей легких и селезенки мышей, зараженных клетками *M. tuberculosis*.

Анализ изменения массы тела мышей линии BALB/c, зараженных штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $1,3 \times 10^5$ КОЕ/животное, не выявил значительных изменений данного показателя на протяжении всего времени эксперимента по сравнению с контролем. Вес селезенки и легких зараженных мышей статистически значимо не увеличивался (рис. 4).

Оценка микобактериальной обсемененности селезенки и легких мышей линии BALB/c, зараженных клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv, не выявила изменения данного показателя на протяжении всего времени эксперимента (рис. 5).

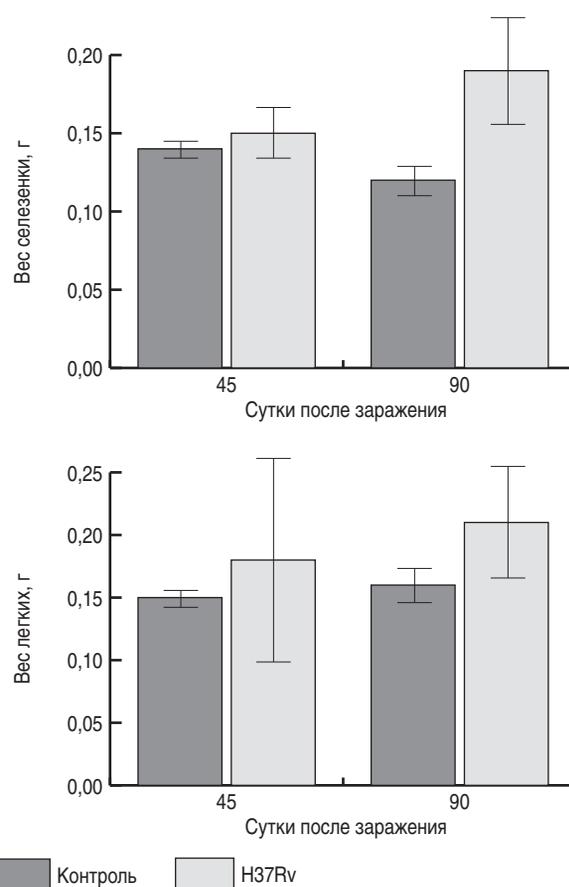


Рис. 4. Изменение веса органов (селезенки и легких) мышей линии BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно клетками *M. tuberculosis* H37Rv.

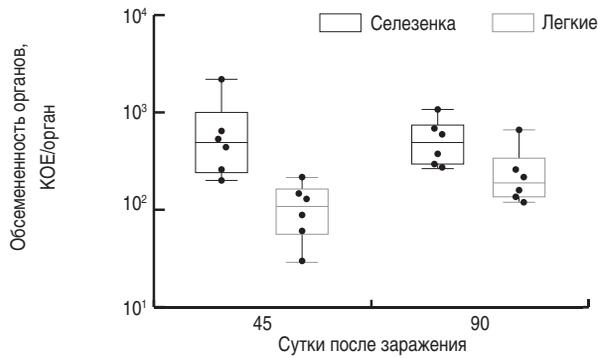


Рис. 5. Микобактериальная обсемененность селезенок и легких мышей линии BALB/c, инфицированных клетками *M. tuberculosis* H37Rv.

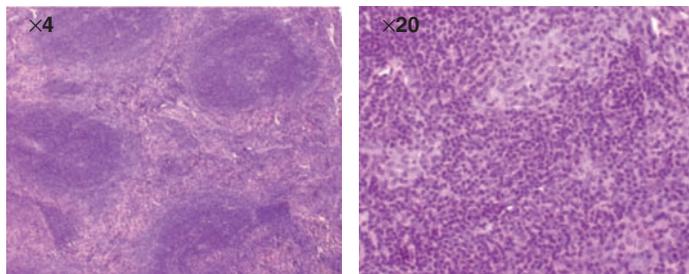


Рис. 6. Патологические изменения в селезенке мышей линии BALB/c на 90-е сутки после внутрибрюшинного заражения клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

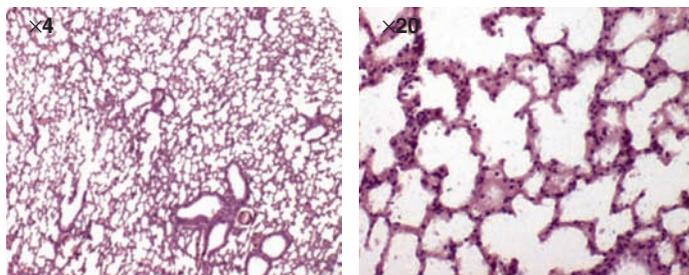


Рис. 7. Гистологические срезы легких мышей линии BALB/c на 90-е сутки после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

В красной пульпе образцов селезенки наблюдается заметное увеличение лимфоцитов, что указывает на развитие ответной реакции иммунной системы при проникновении туберкулезного патогена в макроорганизм. Между лимфоцитарными скоплениями встречаются плотные очаги, состоящие из широкоплазменных макрофагов. В лимфатических фолликулах белой пульпы селезенки не выявлена активность центров размножения, что свидетельствует об отсутствии выраженной гуморальной реакции на присутствие патогена (рис. 6).

Гистологическое исследование тканей легких мышей, зараженных клетками *M. tuberculosis* в респираторном отделе и воздухоносных путях легких, не выявило отклонений от нормы. В исследуемых образцах просветы альвеол были чистые, без клеточной инфильтрации (рис. 7).

Отсутствие патологических изменений в легких мышей, возможно, связано с низким уровнем бактериальной нагрузки в органе после заражения клетками *M. tuberculosis* H37Rv и формирования у мышей хронического туберкулезного процесса, что согласуется с опубликованными ранее данными [12].

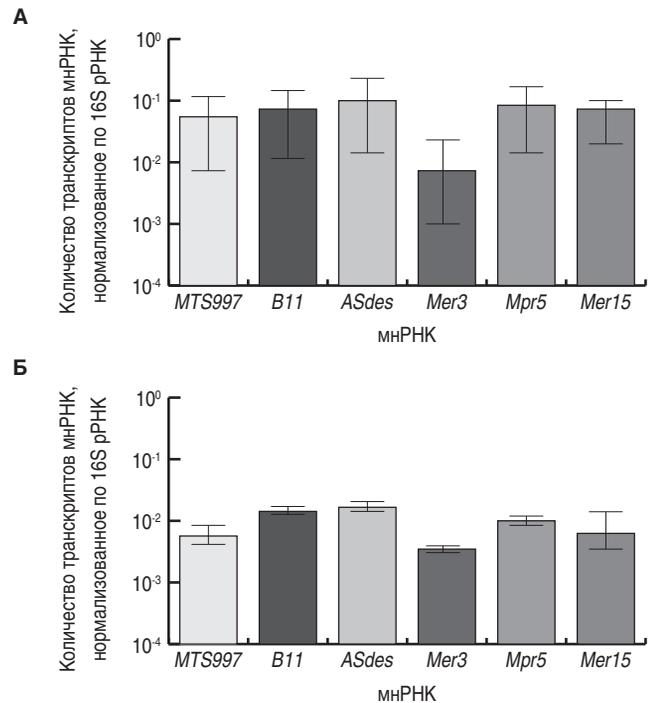


Рис. 8. Представленность транскриптов мнРНК относительно уровня экспрессии 16S рРНК в легких мышей линии BALB/c, инфицированных клетками *M. tuberculosis* H37Rv: А – 45-е сутки после заражения, Б – 90-е сутки после заражения.

Полученные данные указывают на формирование хронической туберкулезной инфекции у мышей линии BALB/c к 90-му дню после внутрибрюшинного заражения клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Представленность транскриптов мнРНК M. tuberculosis H37Rv в легких мышей с хронической туберкулезной инфекцией

Оценка представленности транскриптов мнРНК *M. tuberculosis* в тканях легких мышей с хроническим туберкулезом показала, что в легких животных были детектированы 6 мнРНК из 13 (*MTS0997*, *B11*, *ASdes*, *Mcr3*, *Mpr5* и *Mcr15*). Средний уровень представленности к 90-м суткам после заражения, по сравнению с аналогичным показателем на 45-е сутки после заражения, снижался для *MTS0997* в 9,5 раза, *B11* – в 5,1 раза, *ASdes* – в 6,8 раза, *Mcr3* – в 3,1 раза, *Mpr5* – в 8,3 раза и *Mcr15* – в 7,5 раза (рис. 8).

Таким образом, экспериментально продемонстрировано, что в легких мышей с хронической туберкулезной инфекцией клетки *M. tuberculosis* экспрессируют мнРНК (*MTS0997*, *B11*, *ASdes*, *Mcr3*, *Mpr5* и *Mcr15*), причем уровень экспрессии изменяется с течением времени. Это дополняет сведения о присутствии транскриптов мнРНК в клетках туберкулезного микроба, при хронической туберкулезной инфекции и при переходе туберкулезной инфекции в латентную форму [10].

Заключение

По результатам проведенных экспериментов *in vitro* выявлено увеличение уровней транскрипции гена мнРНК *MTS1338 M. tuberculosis* в ответ на оксидативный стресс. В условиях воздействия повышенной кислотности *in vitro*, которая характерна для среды внутри фагосом, наблюдалось увеличение

уровня экспрессии мнРНК *Mpr5 M. tuberculosis*. Снижение уровней транскрипции мнРНК *ASdes* и *ASpks* в кислой среде в течение первых двух часов воздействия кислотного стресса позволяет предположить участие этих мнРНК в адаптации микобактерий к этому виду стресса. Показано, что в легких мышей с хронической туберкулезной инфекцией клетки *M. tuberculosis* H37Rv экспрессируют мнРНК *MTS0997*, *B11*, *ASdes*, *Mcr3*, *Mpr5* и *Mcr15*, характерные для состояния возбудителя туберкулеза при переходе его в покой. Представленность транскриптов названных мнРНК снижалась к 90-м суткам по сравнению с данным показателем на 45-е сутки после заражения мышей линии BALB/c.

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

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

- Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Moore A, Riesco AB, Schwenk S, Arnvig KB. Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2017 Mar 21;12(3):e0174079. DOI: 10.1371/journal.pone.0174079
- Ostrik AA, Azhikina TL, Salina EG. Small Noncoding RNAs and Their Role in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Biochemistry (Mosc). 2021 Jan;86(Suppl 1):S109-S119. DOI: 10.1134/S000629792114008X
- Schwenk S, Arnvig KB. Regulatory RNA in *Mycobacterium tuberculosis*, back to basics. Pathog Dis. 2018 Jun 1;76(4). DOI: 10.1093/femspd/fty035
- Salina EG, Grigorov A, Skvortsova Y, Majorov K, Bychenko O, Ostrik A, et al. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Nov 26;9:405. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00405
- Taneja S, Dutta T. On a stake-out: Mycobacterial small RNA identification and regulation. Noncoding RNA Res. 2019 May 16;4(3):86-95. DOI: 10.1016/j.ncrna.2019.05.001
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence. 2013 Jan 1;4(1):3-66. DOI: 10.4161/viru.22329
- Feng L, Chen Z, Wang Z, Hu Y, Chen S. Genome-wide characterization of monomeric transcriptional regulators in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology (Reading). 2016 May;162(5):889-897. DOI: 10.1099/mic.0.000257
- Mai J, Rao C, Watt J, Sun X, Lin C, Zhang L, Liu J. *Mycobacterium tuberculosis* 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones. Nucleic Acids Res. 2019 May 7;47(8):4292-4307. DOI: 10.1093/nar/gkz149
- Shepelkova G, Evstifeev V, Averbach JrM, Sivokozov I, Ergeshov A, Azhikina T, Yeremeev V. Small Noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 Affect the Adaptation and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol. Res. 2021 12:186-195. DOI: 10.3390/microbiolres12010014
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Шрамко ПА, Грищенко НС, Рудницкая ТИ, Потапов ВД, Капрельянц АС, Бикетов СФ. Моделирование хронической туберкулезной инфекции у мышей методом внутрибрюшинного заражения и анализ активации аминоганидином мутантов штамма H37Rv с делециями по генам *rpf*. Туберкулез и болезни легких. 2010;87(4):47-50.
- Fursov MV, Shitikov EA, Lagutkin DA, Fursova AD, Ganina EA, Kombarova TI, et al. MDR and Pre-XDR Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains: Assessment of Virulence and Host Cytokine Response in Mice Infectious Model. Microorganisms. 2021 Aug 23;9(8):1792. DOI: 10.3390/microorganisms9081792
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- Mishra A, Suroliá A. *Mycobacterium tuberculosis*: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host. IUBMB Life. 2018 Sep;70(9):917-925. DOI: 10.1002/iub.1882

References

- Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Moore A, Riesco AB, Schwenk S, Arnvig KB. Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2017 Mar 21;12(3):e0174079. DOI: 10.1371/journal.pone.0174079
- Ostrik AA, Azhikina TL, Salina EG. Small Noncoding RNAs and Their Role in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Biochemistry (Mosc). 2021 Jan;86(Suppl 1):S109-S119. DOI: 10.1134/S000629792114008X
- Schwenk S, Arnvig KB. Regulatory RNA in *Mycobacterium tuberculosis*, back to basics. Pathog Dis. 2018 Jun 1;76(4). DOI: 10.1093/femspd/fty035
- Salina EG, Grigorov A, Skvortsova Y, Majorov K, Bychenko O, Ostrik A, et al. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Nov 26;9:405. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00405
- Taneja S, Dutta T. On a stake-out: Mycobacterial small RNA identification and regulation. Noncoding RNA Res. 2019 May 16;4(3):86-95. DOI: 10.1016/j.ncrna.2019.05.001
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence. 2013 Jan 1;4(1):3-66. DOI: 10.4161/viru.22329
- Feng L, Chen Z, Wang Z, Hu Y, Chen S. Genome-wide characterization of monomeric transcriptional regulators in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology (Reading). 2016 May;162(5):889-897. DOI: 10.1099/mic.0.000257
- Mai J, Rao C, Watt J, Sun X, Lin C, Zhang L, Liu J. *Mycobacterium tuberculosis* 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones. Nucleic Acids Res. 2019 May 7;47(8):4292-4307. DOI: 10.1093/nar/gkz149
- Shepelkova G, Evstifeev V, Averbach JrM, Sivokozov I, Ergeshov A, Azhikina T, Yeremeev V. Small Noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 Affect the Adaptation and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol. Res. 2021 12:186-195. DOI: 10.3390/microbiolres12010014
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Shramko PA, Grishchenko NS, Rudnitskaya TI, Potapov VD, Kaprelyants AS, Biketov SF. Simulation of chronic tuberculosis infection in mice by intraperitoneal inoculation and the testing of aminoguanidine-induced activation of *rpf* gene

- deletion mutants of the H37Rv strain. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2010;87(4):47-50. (In Russian).
13. Fursov MV, Shitikov EA, Lagutkin DA, Fursova AD, Ganina EA, Kombarova TI, et al. MDR and Pre-XDR Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains: Assessment of Virulence and Host Cytokine Response in Mice Infectious Model. *Microorganisms*. 2021 Aug 23;9(8):1792. DOI: 10.3390/microorganisms9081792
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
15. Mishra A, Surolia A. *Mycobacterium tuberculosis*: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host. *IUBMB Life*. 2018 Sep;70(9):917-925. DOI: 10.1002/iub.1882

Информация об авторах:

Фурсов Михаил Васильевич, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов 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) 31-2182
E-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

Грищенко Наталья Семеновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов 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) 31-2182
E-mail: natalya.grishenko60@mail.ru

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов 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) 31-2182
E-mail: rudnitsckaya.tat@yandex.ru

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний 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) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии 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) 31-2182
E-mail: ganin43@yandex.ru

Потапов Василий Дмитриевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов 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) 31-2182
E-mail: potapovvd@mail.ru

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:

Mikhail V. Fursov, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: natalya.grishenko60@mail.ru

Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: rudnitsckaya.tat@yandex.ru

Tatyana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Elena A. Ganina, Researcher of Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: ganin43@yandex.ru

Vasily D. Potapov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor.
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: potapovvd@mail.ru

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor.
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: Dyatlov@obolensk.org

Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза

В.И.Дятлова

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

Бруцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных заболеваний, передающихся человеку от инфицированных животных, которое наносит как экономический, так и социальный урон государствам. Существующие сертифицированные вакцины против бруцеллеза не соответствуют в полной мере всем необходимым требованиям безопасности и эффективности для их широкого применения, в первую очередь для людей. Стремительное развитие новых технологий, в частности биоинформатики, может позволить получить качественно новые препараты для профилактики данного заболевания. С помощью методов обратной вакцинологии можно уже на начальном этапе создания вакцин выбрать наиболее иммуногенные белки, способные обеспечить долговременный протективный иммунитет против патогена. В настоящем исследовании был проведен биоинформатический анализ 45 предсказанных поверхностных белков с использованием 24 компьютерных программ и нескольких баз данных с целью выявления наиболее перспективных кандидатов для вакцин. Исследование включало 11 основных этапов. В результате анализа было определено 8 наиболее перспективных кандидатов в вакцины против бруцеллеза, среди которых ЛПС-сборочный белок внешней мембраны бруцелл LptD наиболее полно отвечал всем критериям отбора. LptD является перспективным кандидатом для создания субъединичных и ДНК-вакцин против бруцеллеза.

Ключевые слова: *Brucella*, бруцеллез, антигены, вакцина, обратная вакцинология, биоинформатика

Для цитирования: Дятлова В.И. Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2021; 6(4): 16–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29

Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis

V.I.Dyatlova

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

Brucellosis is one of the most common zoonotic diseases transmitted to humans from infected animals. The disease has negative consequences for the state, both economically and socially. The existing certified brucellosis vaccines do not fully meet all the necessary safety and efficacy requirements for their widespread use, primarily for humans. The rapid development of new technologies, in particular bioinformatics, can make it possible to obtain qualitatively new preparations for the prevention of this disease. Using the methods of reverse vaccinology, it is possible to select the most immunogenic proteins that can provide long-term protective immunity against the pathogen. In the present study, a bioinformatic analysis of 45 predicted surface proteins of *Brucella abortus* were carried out using 24 computer programs in order to identify the most promising candidates for vaccines. The study included 11 main stages. As a result, 8 most promising candidates for vaccines against brucellosis were identified, among which the LPS-assembly protein of the outer membrane of brucella LptD most fully met all selection criteria. LptD is a promising candidate for the development of subunit and DNA vaccines against brucellosis.

Key words: *Brucella*, brucellosis, antigens, vaccine, reverse vaccinology, bioinformatics

For citation: Dyatlova V.I. Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis. Bacteriology. 2021; 6(4): 16–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: varya_dyatlova@mail.ru

Статья поступила 06.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: varya_dyatlova@mail.ru

The article was received 06.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

Бруцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных заболеваний, передающихся человеку от инфицированных животных как при непосредственном контакте, так и при употреблении непастеризованных молочных продуктов. Оно наносит и экономический, и социальный урон государствам, обусловленный частым развитием хронического течения инфекции и инвалидизации переболевших людей.

Вакцинация является перспективным методом профилактики бруцеллеза. В настоящее время широко используются ветеринарные живые аттенуированные вакцины против этого заболевания. Они играют важную роль в борьбе с эпидемиями бруцеллеза, но все же имеют ряд недостатков, включая патогенность для человека, потенциальную возможность самопроизвольного аборта у беременных животных, затруднения при интерпретации диагностических тестов и др. Применяемая в нашей стране для людей сухая живая вакцина на основе штамма *Brucella abortus* 19BA имеет ограниченное использование в связи с большим числом противопоказаний. Международной лицензированной вакцины против бруцеллеза для человека до сих пор не существует. Профилактика заражения людей в первую очередь основана на повышении осведомленности населения, контроле пищевых продуктов, гигиене труда и безопасности лабораторий [1].

Субъединичные и ДНК-вакцины за счет таких преимуществ, как безопасность, экономичность и эффективность, могут решить данную проблему [2, 3]. Однако для их создания необходим тщательный отбор мишеней, способных индуцировать протективный иммунный ответ против патогена. В течение последних двух десятилетий был исследован вакцинный потенциал различных антигенов бруцелл (Omp16, Omp19, Omp25, Omp28, Omp31, GroES, L7/L12, BCSP31, SOD, P39 и др.) и показано значительное снижение бактериальной нагрузки на органы у иммунизированных ими мышей [4–9]. Тем не менее использование одного антигена, как правило, не может обеспечить уровень защиты от бруцеллеза, сопоставимый с живыми аттенуированными вакцинами [3]. Необходимы дальнейшие исследования по выявлению новых антигенов и созданию на их основе мультиантигенных или мультисубъединичных вакцин.

В настоящее время все больше становятся востребованы новые стратегии разработки безопасных, стабильных и эффективных вакцин с помощью таких технологий биоинформатики, как обратная вакцинология, иммуноинформатика и структурная вакцинология.

Обратная вакцинология (ОВ) – это широко распространенный подход для прогнозирования потенциальных вакцин-кандидатов путем скрининга протеома патогена с помощью компьютерного анализа. Он включает определение субклеточной локализации белков, их антигенных, физико-химических свойств и пр. ОВ значительно сокращает время и затраты на разработку вакцин по сравнению с традиционным подходом, позволяет идентифицировать и изучать антигены, присутствующие в небольших количествах или только на определенных этапах жизненного цикла организма, а также белки некультивируемых или опасных микроорганизмов [10, 11].

Первой лицензированной вакциной, созданной с помощью методов ОВ, была вакцина против *Neisseria meningitidis* серо-

группы В (MenB) [12]. Анализ *in silico* генома изолята MenB позволил идентифицировать 600 генов, кодирующих потенциальные поверхностные белки, 350 из которых удалось получить в экспрессионной системе *Escherichia coli* и использовать для иммунизации мышей. Окончательный выбор трех антигенов (NadA, fHbp, NHBA) был обусловлен их высокой защитной способностью, определяемой по бактерицидной активности сывороток мышей и максимальному охвату антигенной изменчивости штаммов MenB. В результате была создана четырехкомпонентная вакцина 4CMenB (Bexsero® (GSK Vaccines)), включающая, кроме трех отобранных белков, также высокоиммуногенный компонент везикул наружной мембраны менингококков PorA P1.4 [13, 14]. Она была одобрена для применения в Европе в 2013 г. для всех возрастных групп и в США в 2015 г. для лиц от 10 до 25 лет [15]. Также в настоящее время с помощью методов ОВ разрабатываются вакцины против *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* и др. [16–20]. Методы ОВ широко используются и при создании вакцин против COVID-19 [21, 22].

Целью данного исследования являлось вычисление белков-кандидатов в вакцины против бруцеллеза методами обратной вакцинологии.

Материалы и методы

Для анализа были использованы последовательности геномов и протеомов бруцелл, полученные в базах данных Genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и UniProt (<http://www.uniprot.org/proteomes>), а именно 10 штаммов *B. abortus*: *B. abortus* 2308 (NCBI:txid359391; NC_007618.1, NC_007624.1; UP000002719), *B. abortus* bv. 1 str. 9-941 (NCBI:txid262698; NC_006932, NC_006933; UP000000540), *B. abortus* bv. 2 str. 86/8/59 (NCBI:txid520450; CP007765.1, CP007764.1; UP000028807), *B. abortus* bv. 6 str. 870 (NCBI:txid520454; CP007709.1, CP007710.1; UP000005091), *B. abortus* str. 63/75 (NCBI:txid:235; CP007663.1, CP007662.1; UP000028790), *B. abortus* bv. 9 str. C68 (NCBI:txid520455; CP007705.1, CP007706.1; UP000003961), *B. abortus* str. BAB8416 (NCBI:txid235; CP008774.1, CP008775.1; UP000035967), *B. abortus* A13334 (NCBI:txid1104320; NC_016795.1, NC_016777.1; UP000006807), *B. abortus* str. NCTC 10505 (NCBI:txid235; CP009625.1, CP009626.1; UP000028785), *B. abortus* 104M (NCBI:txid1210454; CP009625.1, CP009626.1; UP000064067); геномы видов *B. abortus* (NCBI:txid235), *B. melitensis* (NCBI:txid29459), *B. suis* (NCBI:txid29461), *B. canis* (NCBI:txid36855), *B. pinnipedialis* (NCBI:txid120576). Также использовались аминокислотные последовательности протеомов человека (*Homo sapiens*, NCBI:txid9606; UP000005640), мыши (*Mus musculus*, NCBI:txid10090; UP000000589), морской свинки (*Cavia porcellus*, NCBI:txid10140; UP000005447), кролика (*Oryctolagus cuniculus*, NCBI:txid9986; UP000001811), крупного рогатого скота (*Bos taurus*, NCBI:txid9913; UP000009136), козы (*Capra hircus*, NCBI:txid9925; UP000291000), овцы (*Ovis aries*, NCBI:txid9940; UP000002356), свиньи (*Sus scrofa*, NCBI:txid9823; UP000008227) и собаки (*Canis lupus familiaris*, NCBI:txid9615; UP000002254).

Этапы анализа протеомов представлены на рис. 1.



Рис. 1. Этапы анализа протеомов бруцелл методами обратной вакцинологии.

1. Определение субклеточной локализации белков

Для прогноза субклеточной локализации белков протеомов исследуемых штаммов были использованы компьютерные программы PSORTdb4.0 (<https://db.psорт.org>), Vaxign2 (<http://www.violinet.org/vaxign2>), CELLOv.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). PSORTdb4.0 включает набор аналитических алгоритмов, таких как метод опорных векторов (Support Vector Machine/SVM), скрытую марковскую модель (Hidden Markov Model/HMM), средство поиска основного локального

выравнивания (Basic Local Alignment Search Tool/BLAST), алгоритм поиска ассоциативных правил (Apriori) и др. Данный многокомпонентный подход позволяет учитывать одновременно несколько характеристик каждого белка, включая наличие у него сигнальных последовательностей, трансмембранных петель, специфических мотивов и участков гомологии с белками известной локализации, с целью более точного предсказания расположения его в клетке [23–25].

Vaxign2 – это первая зарегистрированная публично доступная система дизайна вакцин, включающая множество программ, позволяющих определять субклеточную локализацию белка (PSORTb2.0), его трансмембранные сегменты (HMMTOP, основанная на HMM), адгезивность (SPAAN), консервативные участки между разными геномами, исключая при анализе сходные участки с непатогенными штаммами микроорганизмов, сравнивать аминокислотные последовательности предсказанных белков и белков хозяина (OrthoMCL, основанная на BLAST), предсказывать Т-клеточные эпитопы, связывающие молекулы МНС I и МНС II (Vaxitope, основанная на методе позиционной весовой матрицы PSSM (Position Specific Scoring Matrix)), проводить функциональный анализ белков (DAVID) [26].

Для предсказания субклеточной локализации белков была также использована программа CELLOv.2.5, которая включает многокомпонентную систему классификации SVM с 4 типами схем кодирования последовательностей: аминокислотный состав, дипептидный состав, расщепленный аминокислотный состав и состав последовательности на основе физико-химических свойств аминокислот [25].

С помощью программ PSORTdb4.0, Vaxign2, CELLOv.2.5 были отобраны белки, находящиеся во внешней мембране и внеклеточном матриксе бруцелл, общие для всех 10 исследуемых штаммов.

2. Идентификация гомологов белков человека

Предсказанные общие для всех штаммов поверхностные мембранные и секретируемые белки были подвергнуты анализу локального выравнивания BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastx) против протеома человека на серверах NCBI и UniProt (cutoff для гомологов: E-value <0,005, идентичность >35%). Белки, удовлетворяющие этим критериям, рассматривались как гомологи человеческих и исключались из исследования [27].

Кроме того, с помощью программы PBIT (<http://www.pbit.bicnirrh.res.in/index.php>), основанной на BLAST, были вычислены гомологи белков микробиоты кишечника человека, (E-value <0,005, идентичность >50%), и в BLASTp – гомологи белков лабораторных животных (мыши, морские свинки, кролики) и млекопитающих, восприимчивых к патогенным для человека видам бруцелл (крупный рогатый скот, козы, овцы, свиньи, собаки) (E-value <0,005, идентичность >35%), которые исключались из анализа [28].

3. Вычисление адгезинов

Вероятность того, что белок является адгезином, рассчитывалась в программе Vaxign2. При коэффициенте адгезии более 0,5 белок рассматривался как адгезивный.

4. Анализ антигенности белков. Прогнозирование вирулентных, патогенных и протективных антигенов

Антигенность белков анализировали с помощью VaxiJen v.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). Этот метод основан на автокросс-ковариантном преобразовании белковых последовательностей в однородные векторы без их выравнивания [29]. В целях повышения точности прогноза и минимизации ложноположительных результатов использовали пороговое значение $\text{cutoff} \geq 0,4$.

Вирулентность белков рассчитывалась в программе VirulentPred (<http://203.92.44.117/virulent/>), основанной на двухслойном каскадном SVM: первый слой включал оценку индивидуальных особенностей белковых последовательностей и профилей сходства белков методами SVM и PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) с пятикратной перекрестной проверкой, второй слой – финальный прогноз с SVM [30]. Пороговое значение для отбора вирулентных белков составляло $\text{cutoff} \geq 1$.

Патогенные белки определяли в программе MP3 (<http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/index.php>). Инструмент MP3 использует интегрированный подход с двумя методами (SVM и HMM) для повышения эффективности и точности предсказания патогенных белков в геномных и метагеномных базах данных [31]. Пороговое значение составляло $\text{cutoff} > 0$.

Прогноз протективных антигенов осуществлялся в Vaxign-ML (<http://www.violinet.org/vaxign/vaxign-ml/index.php>), которая использует до 509 биологических и физико-химических характеристик каждой белковой последовательности для предсказания защитных антигенов. В ее основе лежит алгоритм экстремального градиентного бустинга (XGBoost) и данные базы защитных антигенов Protegen [32]. Белки, для которых в программе было получено значение протективности $< 90\%$ и классифицированные в программе как «непротективные», исключались из работы.

5. Аллергенность белков

Аллергенность белков определялась в программе AllerTOPv.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html>), основанной на автокросс-ковариантном преобразовании белковых последовательностей в однородные векторы одинаковой длины, в ней белки классифицируются с помощью алгоритма k -ближайших соседей на основе обучающего набора из почти 2500 известных аллергенов и неаллергенов [33].

6. Расчет иммуногенности белков

С помощью NetMHC4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) и NetMHCII-2.3 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3>), использующих для расчетов искусственные нейронные сети, были предсказаны 9-мерные и 15-мерные Т-эпитопы, связывающие МНС I (аллеля HLA-A0201) и МНС II (аллеля HLA-DRB1_0101) соответственно. Показатели плотности Т-эпитопов (ПЭ) в белках вычислялись по формуле: $\text{ПЭ} = \text{число рассчитанных эпитопов} / \text{длина полипептида}$. Затем рассчитывалось среднее значение двух ПЭ для каждого белка [34–36].

Общая иммуногенность белков (как сумма показателей иммуногенности составляющих их пептидов, связывающих

МНС I) определялась в программе Class I Immunogenicity на сервере базы данных иммунных эпитопов IEDB (Immune Epitope Database) (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>), которая использует свойства аминокислот, а также их положение в пептиде для прогнозирования иммуногенности комплекса пептида-МНС I. Более высокая оценка указывает на большую вероятность индукции иммунного ответа. Белки, для которых получены отрицательные значения иммуногенности, исключались из работы [37].

7. Выявление белок-белковых взаимодействий

Взаимодействие между белками определяли с помощью базы данных STRING v.11.5 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <https://string-db.org/>). Для расширенного анализа STRING использует как хорошо известные системы классификации (Gene Ontology/GO и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes/KEGG), так и новые системы, основанные на высокопроизводительном интеллектуальном анализе текста, а также на иерархической кластеризации самой сети ассоциаций [38, 39]. Параметрами отбора белков в работе служили следующие параметры: p -значение обогащения белок-белковых взаимодействий (при значении ниже порогового указывает на то, что узлы не являются случайными и наблюдаемое количество ребер является значительным) $< 0,05$, средний коэффициент локальной кластеризации (показывает степень связи узлов (nodes) в сети) $> 0,7$, средняя степень узла (количество взаимодействий, которое в среднем имеет белок в сети) > 3 , превышение количества ребер (edges) над ожидаемым (в случае, если бы узлы были выбраны случайным образом). Белки, для которых не выявлено достоверное число взаимодействий, исключались из работы.

8. Прогнозирование мембранной топологии белков

Для прогнозирования мембранной топологии белков использовали программу DeepTMHMM (<https://biolib.com/DTU/DeepTMHMM/>), модель глубокого обучения, основанную на блоках долгой краткосрочной памяти и условных случайных полях. В ней определялись наиболее вероятная топология белков (трансмембранная локализация, внешняя или внутренняя поверхности наружной бактериальной мембраны), расположение структурных элементов (сигнальной последовательности, трансмембранных α -спиралей, β -тяжей), тип белка (трансмембранный, секреторный, глобулярный).

Трансмембранные α -спирали в структуре белков также вычислялись в TMHMMv.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), основанной на HMM [40]. Аминокислотная последовательность белков, как и во всех программах, использованных в работе, вводилась в FASTA-формате, результаты демонстрировали количество, размер и локализацию трансмембранных α -спиралей. Белки, в которых было вычислено более 1 трансмембранной спирали, исключались из анализа.

Прогнозирование топологии предполагаемых трансмембранных β -цилиндрических белков проводили методом VOSTOPUS2 (<https://b2.topcons.net/pred/>) в режиме двухэтапного подхода вычислений: на первом этапе применяются 4 отдельных SVM для определения местоположения каждого остатка (обращенного к поре или липидному слою,

внутренние и наружные петли), на втором этапе – HMM для прогнозирования общей топологии [41, 42].

В SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>), основанной на языковой модели-трансформере с условным случайным полем для структурированного прогнозирования, вычислялись тип сигнальной последовательности (сигнальный пептид Sec/SPI, транспортируемый транслоконом Sec и расщепляемый сигнальной пептидазой I (Lep), Sec/SPII – липопротеиновый сигнальный пептид, расщепляемый сигнальной пептидазой II (Lsp), Tat/SPI и Tat/SPII – Tat-сигнальные пептиды, транспортируемые Tat, Sec/SPIII – пилин и пилин-подобные сигнальные пептиды, транспортируемые Sec и расщепляемые сигнальной пептидазой III (PiiD/PibD)), сайты расщепления в анализируемых поверхностных бруцеллезных белках и соответствующая вероятность [43, 44].

9. Определение физико-химических характеристик белков

Основные физико-химические характеристики белков (аминокислотный состав, молекулярную массу, теоретическую изоэлектрическую точку (pI), коэффициент экстинкции, расчетный период полураспада *in vivo*, алифатический индекс (AI) (чем выше AI, тем выше термостабильность белка), индекс нестабильности (ИН) (белок стабилен в пробирке при ИН <40), среднее значение гидроксипатичности GRAVY (GRAVY <0 характеризует гидрофильность белка) и др.) определяли с помощью инструмента ProtParam tool на сервере ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) [45].

Наличие и расположение дисульфидных мостиков в белках рассчитывали в программе DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>), которая использует нейронную сеть прямого распространения для определения степени окисления цистеина и дисульфидной связности белка, учитывая только его аминокислотную последовательность [46].

Растворимость белка при избыточном его производстве в *E. coli* определялась в программе SOLpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>), в которой применяется двухстадийная архитектура SVM [47], а также в программе Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>), которая использует модели машинного обучения, тренированные на наборе данных из 137 последовательностей терапевтических антител и на 12 биофизических платформах, для прогнозирования растворимости белков [48].

10. Определение основных (незаменимых) белков

На сервере DEG v.15.0. (<http://www.essentialgene.org>) методом BLASTp было проведено сравнение последовательностей исследуемых белков с незаменимыми белками из базы DEG v.15.0 [49]. Параметры отбора для основных белков были следующие: идентичность >35%, bit score >100, E-value >1E-15.

11. Анализ консервативности гена выбранного белка для патогенных для человека видов *Brucella*

С помощью BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn) было проведено локальное выравнивание гена выбранного белка

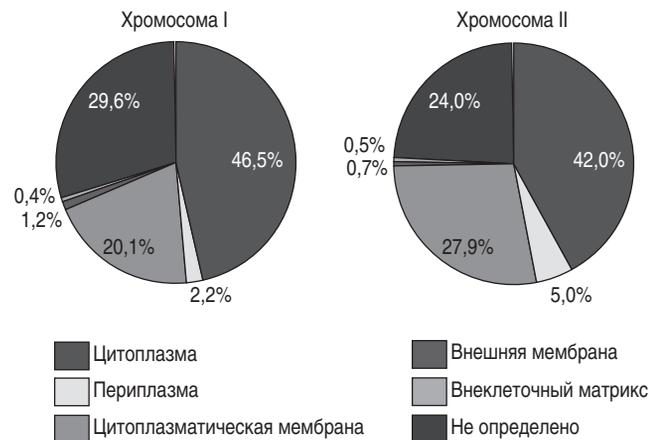


Рис. 2. Процентное распределение прогнозируемых белков *B. abortus* bv. 1 str. 9-941 по их субклеточной локализации (PSORTdb 4.0).

против генома рода *Brucella*, а также против геномов патогенных для человека видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*. При оценке гомологии нуклеотидных последовательностей учитывались показатели идентичности (99–100%), охвата (100%) и значимости выравнивания (E-value <0,05).

Результаты и обсуждение

1. Определение субклеточной локализации белков

Протеомы 10 исследуемых штаммов *B. abortus*, представленные в базе UniProt, включают от 3023 до 3326 белков. Из них, согласно расчетам в программах PSORTdb 4.0 и Vaxign 2, по крайней мере 25–31 белок каждого штамма располагается во внешней мембране клетки и 12–14 белков – это секретируемые внеклеточные белки. С помощью программ Vaxign 2, BLAST, CELLO v.2.5 было вычислено 45 поверхностных белков, общих для всех исследуемых штаммов *B. abortus* (табл. 1). На рис. 2 представлена диаграмма процентного распределения белков, экспрессирующихся с двух хромосом *B. abortus* bv. 1 str. 9-941, составленная по данным программы PSORTdb 4.0.

2. Идентификация гомологов белков человека

Идентифицированные поверхностные бруцеллезные белки исследовали на предмет их сходства с белками протеома человека с помощью программы BLASTp. Из 45 белков только 39 соответствовали заявленным выше критериям, то есть не являлись гомологами человеческих белков (табл. 1). Также для 8 белков выявлена гомология с белками микробиоты кишечника человека и для 2 белков – с белками лабораторных животных (мыши, морские свинки, кролики) и млекопитающих, восприимчивых к патогенным для человека видам бруцелл (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, собаки).

3. Расчет адгезивности белков

Из 34 отобранных поверхностных и секретируемых бруцеллезных белков 26 были идентифицированы как адгезины в программе Vaxign2. Среди них наибольшие значения адгезивности были вычислены для WP_002967016.1 (0,9) и WP_002964998.1 (0,88).

Таблица 1. Анализ поверхностных бруцеллезных белков методами обратной вакцинологии																			
Номер белка в NCBI-Protein	Название белка	Количество aa																	
			–	=	≡	≧	>	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	
WP_002966739.1	LptD	792	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	26	а	+
WP_002965367.1	Omp25d	230	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	8	а	-
WP_002965368.1	Omp25c	228	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	8	а	-
WP_002964462.1	BhuA	620	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	22	а	-
WP_002966644.1	FlgE	396	в	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	г	-	-	-	-
WP_002967184.1	FlgH	242	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	-	б	-
WP_002969598.1	AlgEfp	417	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	г	-	18	-	-
WP_002963597.1	MliCfp	121	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	-	а	-
WP_002966591.1	TonB	661	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	с	-	22	а	-
WP_002965376.1	FghA	278	в	г	г	г	-	+	-	-	+	-	+	+	г	-	2	-	+
WP_002963836.1	Ndk	140	в	г	г	г	-	-	-	-	-	а	+	+	г	-	-	-	+
WP_002963986.1	PGb3dp	253	в	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	т	1	-	-	-
WP_002971034.1	PNPLA	315	в	-	г	-	-	-	-	-	-	-	+	+	г	-	-	-	+
WP_002964637.1	Lp	184	в	-	-	-	+	+	+	+	+	а	-	+	с	-	-	б	-
WP_002966987.1	Phagerp	458	в	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	г	-	-	-	-
WP_002966988.1	TsaD	359	в	г	г	г	+	+	-	-	+	-	+	+	т	-	-	-	+
WP_002967016.1	BigB	518	в	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	г	-	-	-	-
WP_002965213.1	M22	229	в	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	т	-	-	-	+
WP_002971772.1	D15	639	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	с	-	16	-	-
WP_002969669.1	YadAfp	1333	м	-	г	-	+	+	+	+	+	а	+	+	г	-	4	а	-
WP_002969883.1	Omp2a	321	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	14	а	-
WP_002971512.1	Omp2b	362	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	16	а	-
WP_002963844.1	Omp25	213	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	8	а	-
WP_002964008.1	SPORdp	990	м	г	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	г	2	-	-	-
WP_002964019.1	LysM	432	м	-	г	-	+	+	-	+	+	а	-	+	г	-	-	б	+
WP_002964049.1	RNA-bp	1132	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	т	1	2	-	-
WP_011265341.1	BepC	456	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	г	-	4	а	-
WP_075589504.1	Trp	323	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	г	-	12	-	-
WP_002964282.1	BamA	781	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	с	1	16	а	+
WP_002964402.1	Omp22	212	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	1	8	а	-
WP_002964530.1	BamD	287	м	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	с	-	-	б	+
WP_011265365.1	OmpW	227	м	-	-	-	+	+	-	-	+	а	+	+	с	1	8	а	-
WP_002964719.1	Omp31b	261	м	-	-	-	+	+	+	+	+	а	+	+	с	-	8	а	-
WP_002964782.1	YbgF	488	м	г	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	г	-	-	а	-
WP_002966947.1	Pal	168	м	-	-	-	-	+	-	+	-	а	+	+	с	-	-	б	+
WP_002964998.1	Omp19	177	м	-	-	-	+	+	+	+	+	а	-	+	с	-	-	б	-
WP_002967168.1	Ompβb	512	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	18	а	-
WP_002966502.1	Omp10	126	м	-	-	-	+	+	+	+	-	а	+	+	с	-	-	б	-
WP_002971189.1	BhuA	676	м	-	г	-	-	+	-	+	+	-	+	-	с	-	22	а	-
WP_002965726.1	Porinfp	284	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	1	8	а	-
WP_002967131.1	FlgK	484	м	-	-	-	+	+	+	+	+	а	-	+	г	-	-	-	-
WP_002966373.1	Patatin	293	в	-	-	-	-	+	-	-	-	а	+	+	г	-	-	-	-
WP_002965683.1	TPRdp	295	в	г	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	с	-	-	б	-
WP_002966649.1	FlgD	137	в	-	г	-	+	+	+	+	+	а	-	+	г	-	-	-	-
WP_002966636.1	FliC	282	в	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	г	-	-	-	-

Условные обозначения: aa – аминокислоты; bp (binding protein) – связывающий белок; dp (domain protein) – белок, содержащий домен; fp (family protein) – белок, принадлежащий семейству; Lp – липопротейн; Trp – транспортер; l – субклеточная локализация (м – мембрана, в – внеклеточный матрикс) (PSORTdb); II – гомологи (г) белков человека (BLASTp); III – гомологи белков микробиоты кишечника человека (PBIT); IV – гомологи белков животных (лабораторных и чувствительных к бруцеллезу)(BLASTp); V – адгезины (Vaxign2); VI – антигены (Vaxijen2); VII – вирулентные антигены (VirulentPred); VIII – патогенные антигены (MP3); IX – протективные антигены (Vaxign-ML); X – аллергены (a) (AllerTOPv.2); XI – иммуногенность; XII – достоверное количество белок-белковых взаимодействий (STRINGv11.5); XIII – мембранная топология (т – трансмембранные, с – секретируемые, г – глобулярные белки) (DeepTMHMM); XIV – число трансмембранных α-спиралей (TMHMMv.2); XV – число трансмембранных β-тяжей (BOCTOPUS2); XVI – тип сигнального пептида (а – Sec/SPI, б – Sec/SPII) (SignalP-6); XVII – гомологи незаменимых белков (DEG v.15).

4. Анализ антигенности белков. Вычисление вирулентных, патогенных и протективных антигенов

Антигенность белков оценивали с использованием Vaxijen v2.0. У 25 из 26 белков значение антигенности было $>0,4$ (кроме WP_002964530.1, 0,284). Наиболее высокий показатель антигенности – у белка WP_002966502.1 (0,82). В программе VirulentPred 16 из 25 белков были определены как вирулентные. Из них все 16 были классифицированы как патогенные в MP3.

Наибольшие значения вероятности патогенности белка были получены для WP_002964998.1 (4,36), WP_002967016.1 (3,43). В Vaxign-ML протективность всех 16 исследованных белков была $>90\%$, однако WP_002966502.1 был классифицирован в программе как «непротективный» и исключен из работы. Максимальные значения показателя были вычислены для WP_002966591.1 (99,3%) и WP_002966636.1 (98,6%).

5. Определение аллергенности

Согласно результатам анализа *in silico* (AllerTOP v.2.0), 4 белка (WP_002964637.1, WP_002964719.1, WP_002964998.1, WP_002967131.1) из 15 прогностически являлись аллергенами и были исключены из анализа.

6. Расчет иммуногенности белков

Показатели плотности Т-эпитопов, связывающих MHC I и MHC II, для всех 11 белков были $>0,9$, что косвенно указывает на иммуногенность белков. Наибольшее значение среднего двух показателей было получено для белка WP_002966739.1 (0,985), наименьшее – для WP_002966644.1 (0,903).

Среди 11 белков на сервере IEDB отрицательные значения показателей иммуногенности были получены для WP_002966636.1 (-4,18) и WP_002967016.1 (-0,01), они были исключены из исследования. Для остальных 9 белков были вычислены положительные значения показателя (максимальные значения для WP_002966591.1 (7,44) и WP_002966739.1 (7,33)).

7. Выявление белок-белковых взаимодействий

В программе STRING v11.5 для 8 (WP_002965367.1, WP_002965368.1, WP_002966739.1, WP_002964462.1, WP_002967184.1, WP_002966644.1, WP_002969598.11PL35, WP_002963597.1) из 9 белков выявлено достоверное количество взаимодействий (p -значение $<0,05$, средний коэффициент локальной кластеризации $>0,7$) для утверждения, что эти белки являются биологически значимыми. Например, для белка WP_002967184.1 (FlgH) получены следующие данные: p -значение $<1,0e-16$, средний коэффициент локальной кластеризации = 1, средняя степень узла = 10, количество ребер (55) превышает ожидаемое число (11) (рис. 3).

8. Прогнозирование мембранной топологии белков

При вычислении мембранной топологии всех 45 белков в DeepTMHMM 4 белка были определены как трансмембранные (WP_002963986.1, WP_002966988.1, WP_002965213.1, WP_002964049.1), 24 белка – секретруемые и 17 – глобулярные белки, расположенные на внутренней стороне наружной бактериальной мембраны. Из 8 отобранных белков только WP_002966644.1 (Рис. 4б) и WP_002969598.11PL35 были определены как глобулярные белки, остальные 6 – се-

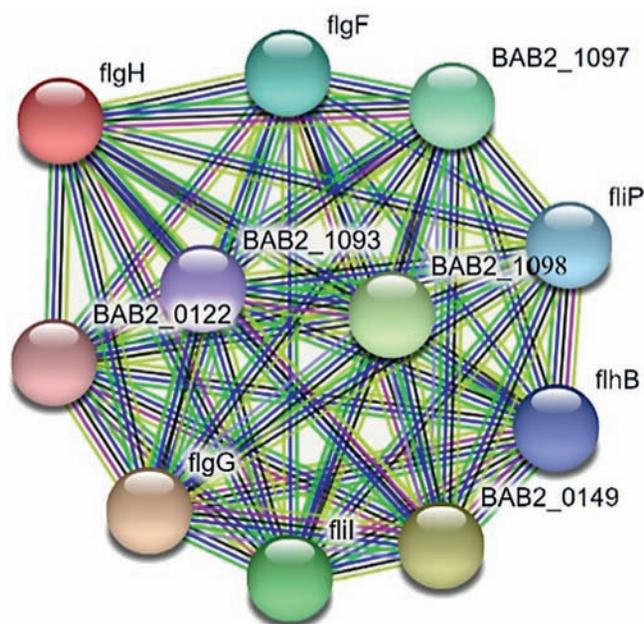


Рис. 3. Графическое изображение белок-белковых взаимодействий белка WP_002967184.1 (FlgH) (STRING v11.5).

Цвет линий: розовый – взаимодействия, выявленные экспериментально, голубой – отобранные из баз данных, зеленый – гены белков расположены рядом, красный – слияние генов, синий – совместное возникновение генов, светло-зеленый – интеллектуальный анализ текстов, черный – ко-экспрессия белков, фиолетовый – гомология белков.

кретируемые белки, содержащие сигнальные пептиды длиной от 17 до 35 аминокислотных остатков, расположенные на внешней стороне наружной мембраны бруцелл (рис. 4).

Среди 45 белков первично только у WP_002964008.1 в TMHMMv.2.0 и WP_002963986.1 в DeepTMHMM было выявлено по 2 трансмембранных α -спирали, и они уже были исключены из работы на предыдущих этапах отбора. В структурах всех 8 отобранных кандидатов отсутствуют трансмембранные α -спирали.

С помощью программы VOSTOPUS2 было выявлено 22 белка (из 45), содержащих β -тяжи (от 2 до 26). В 5 из 8 отобранных белков обнаружены трансмембранные β -цилиндры (с числом β -тяжей от 8 до 26). Пример графического анализа топологии белка в программе VOSTOPUS2 представлен на рис. 5.

В программе SignalP-6.0 у 19 из 45 белков были выявлены сигнальные последовательности типа Sec/SPI, у 8 – липидные сигнальные пептиды Sec/SPII, у остальных 18 они не были обнаружены. Во всех отобранных белках, кроме WP_002966644.1 и WP_002969598.1, присутствуют сигнальные пептиды типа Sec/SPI (для 5 белков) или Sec/SPII (WP_002967184.1) (рис. 6).

9. Определение физико-химических характеристик белков

При помощи ProtParam tool рассчитали физико-химические параметры 8 отобранных бруцеллезных белков: число аминокислотных остатков, теоретическая изоэлектрическая точка (pI), коэффициент молярной экстинкции белка на длине волны 280 нм, общее количество отрицательно (Asp + Glu) и положительно (Arg + Lys) заряженных остатков и др.) (табл. 2).

Таблица 2. Физико-химические характеристики 8 бруцеллезных белков

Номер белка в NCBI-Protein / Характеристики белков	WP_002966739.1	WP_002964462.1	WP_002967184.1	WP_002965367.1	WP_002965368.1	WP_002966644.1	WP_002969598.1	WP_002963597.1
Название белка	LptD	BhuA	FlgH	Omp25d	Omp25c	FlgE	AlgEfp	MliCfp
Количество аа	792	620	242	230	228	396	417	121
Мм, кДа	88,5	66,8	25,9	24,7	24,5	40,8	46,2	12,8
pI	5,37	5,26	9,21	9,28	4,78	4,49	5,34	5,04
ЧЗО- (Asp+Glu)	91	73	24	19	25	38	42	13
ЧЗО+ (Arg+Lys)	78	60	28	24	19	24	33	11
Индекс нестабильности	32,17	36,77	33,45	11,9	22,47	20,34	19,31	27,76
GRAVY	-0,416	-0,346	-0,386	-0,255	-0,092	-0,112	-0,346	0,092
Алифатический индекс	70,98	73,23	82,69	73,48	78,38	82,5	74	93,64
Коэффициент экстинкции ¹	129860	76335	14440	41370	42860	29340	91790	25565
Дисульфидные мостики, аа	18–165, 168–751	14–166	-	-	-	-	-	47–118
Растворимость ²	0,189	0,309	0,496	0,522	0,57	0,593	0,238	0,637
Растворимость ³	0,655	0,442	0,61	0,367	0,341	0,188	0,214	0,946

Условные обозначения: аа – аминокислоты; Мм – молекулярная масса, ЧЗО – число заряженных остатков, ¹ – единицы измерения М⁻¹см⁻¹, ² – вероятность растворимости белка в Protein-Sol (cutoff >0,45), ³ – в SolPro (cutoff >0,5).

Расчетные молекулярные массы белков составили от 12,8 кДа (WP_002963597.1) до 88,5 кДа (WP_002966739.1), что соответствует значениям, установленным в качестве критерия отбора. Индексы нестабильности всех кандидатов в вакцины были <40, что указывает на стабильную природу белков в пробирке. Алифатический индекс кандидатов – >70, что позволяет предположить, что все белки имеют высокую термостабильность. Расчетный период полураспада «вакцин», прогнозируемый с помощью ExPASy, составил >30 ч в ретикулоцитах млекопитающих, >20 ч в дрожжах и >10 ч в *E. coli*. Общая средняя оценка гидрофобности (GRAVY) для всех белков была ниже нуля (кроме WP_002963597.1 (0,092), что указывает на то, что большинство вакцинных кандидатов имеют гидрофильную природу, то есть могут взаимодействовать с водной средой.

Согласно расчетам в программе Protein-Sol большую растворимость, чем средний растворимый белок *E. coli* (cutoff >0,45) из экспериментального набора данных, при экспрессии в *E. coli* должны иметь WP_002963597.1, WP_002967184.1, WP_002965367.1, WP_002965368.1 и WP_002966644.1. Однако в программе Solpro только белки WP_002963597.1, WP_002966739.1 и WP_002967184.1 были определены как «растворимые при сверхэкспрессии в *E. coli*» (cutoff >0,5). Дисульфидные мостики, обеспечивающие стабильность третичных структур белков, вычислены для WP_002963597.1, WP_002966739.1 и WP_002964462.1.

10. Определение основных (незаменимых) белков

Анализ BLASTp показал, что из 8 бруцеллезных белков только для WP_002966739.1 выявлена достоверная гомоло-

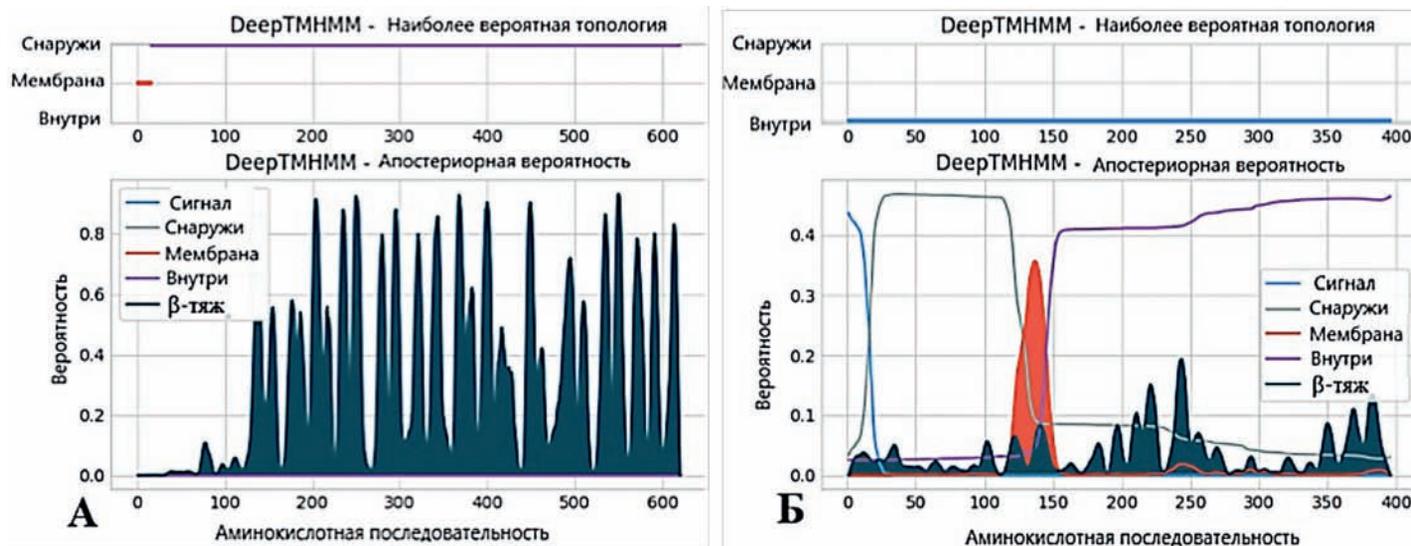


Рис. 4. Мембранная топология белков WP_002964462.1 (А) и WP_002966644.1 (Б) (DeepTMHMM).

На первом этапе работы с помощью трех серверов вычислялись поверхностные секретируемые белки и белки внешней мембраны бруцелл как наиболее доступные для иммунной системы и, наиболее вероятно, являющиеся антигенами [52]. Для более чем 23% белков протеомов *B. abortus* не была определена субклеточная локализация, и, таким образом, некоторые поверхностные антигены бруцелл могли быть упущены из анализа. Тем не менее в работе было определено 45 поверхностных белков, общих для всех 10 штаммов *B. abortus*.

Важным этапом анализа протеомов было исключение из работы белков, имеющих высокую гомологию (>35%) с белками человека. Это обусловлено тем, что сходство вакцинного препарата с белками человека может стать причиной возникновения в организме перекрестной реактивности на него и формирования аутоиммунного ответа [53].

Так как микробиота кишечника человека является важным компонентом иммунной защиты организма от патогенных микроорганизмов, из работы исключались белки, гомологичные белкам микроорганизмов нормальной микрофлоры кишечника. С одной стороны, при использовании подобных антигенов возможна перекрестная реактивность с белками микробиоты кишечника и развитие дисбактериоза, с другой – толерантность к антигенным детерминантам нормофлоры может распространиться и на вакцинные белки [54, 55].

Кроме того, гомологи белков лабораторных животных (мышей, морских свинок, кроликов) и животных, чувствительных к патогенным для человека видам бруцелл (коров, коз, овец, свиней, собак), также отсеивались на данном этапе исследования в связи с теоретической необходимостью испытания вакцин на животных.

В связи с тем, что способность к адгезии является ключевой характеристикой, общей для многих экспериментально подтвержденных протективных антигенов, высокая адгезивность белков рассматривалась как один из положительных факторов отбора [42].

Вакцина против бруцеллеза должна быть как антигенной, так и иммуногенной по своей природе. С помощью компьютерных программ были предсказаны антигены среди исследуемых белков, отобраны антигены с высокими расчетными показателями вирулентности, патогенности, протективности, а также не являющиеся аллергенами.

Плотность Т-эпитопов в белках является одним из косвенных показателей иммуногенности белков. Таким образом, согласно результатам анализа, можно предположить, что все исследуемые белки обладают потенциалом для стимулирования клеточного звена иммунитета. Однако M.Halling-Brown et al. высказывают точку зрения, что прогнозирование вакцин-кандидатов на основе высокой плотности эпитопов, связывающих МНС, в белках не имеет большого значения, так как, вероятнее всего, из-за недостаточной точности программного обеспечения для прогнозирования, низкой частоты гидрофобных остатков, особенно в N-концевом положении, в вакцинных антигенах или эволюционного давления, оказываемого на бактерии иммунной системой, число пептидов, связывающих HLA, оказывается гораздо меньше, чем предсказано *in silico* [56, 57].

На сервере базы данных иммунных эпитопов IEDB с помощью инструмента Class I Immunogenicity было определе-

но, что 80% анализируемых в работе поверхностных белков бруцелл обладают иммуногенностью. Высокая оценка (>5), полученная для 7 белков, указывает на большую вероятность индукции ими выраженного иммунного ответа.

Белок-белковые взаимодействия, прямые (физические) и косвенные (функциональные), определяли с помощью базы данных STRING v11.5, которая содержит информацию о 67,6 млн белков от более чем 14000 организмов и более 20 млрд взаимодействий, полученную из экспериментальных данных, литературных источников, других баз данных и с помощью методов вычислительного прогнозирования (на основе ко-экспрессии и сравнительного анализа геномного контекста) [39]. В данной работе для 8 из 9 отобранных белков было выявлено достоверное число взаимодействий с другими белками.

Многие исследователи отмечают, что мембранная топология белков коррелирует с их иммуногенностью. Так, в исследовании E.Ong et al. выявлена положительная взаимосвязь между антигенопротективностью белков граммотрицательных патогенов и присутствием в их структурах трансмембранных β -цилиндров и отсутствием трансмембранных α -спиралей [41, 42]. Было показано, что белки с более чем одной трансмембранной α -спиралью не всегда возможно получить в пространственных экспрессионных системах, поэтому такие белки были исключены из исследования. Так, в статье M.Pizza et al. сообщалось, что из 600 вакцинных кандидатов против менингококка группы B, вычисленных методом ОВ, 250 белков *N. meningitidis* не удалось экспрессировать в системе *E. coli* из-за присутствия в их структуре двух и более трансмембранных спиралей [13]. Наличие трансмембранных β -цилиндров рассматривалось как дополнительный положительный фактор при отборе кандидатов в вакцины.

Также определялись наличие и типы сигнальных последовательностей в белках. Присутствие лидерного пептида в белке может способствовать увеличению растворимости и стабильности целевого белка при его гетерологичной экспрессии, повышению уровней его внеклеточной секреции и в целом жизнеспособности клеток [58].

Кроме того, в недавних исследованиях было показано, что сигнальный пептид не только обеспечивает секрецию белка, но способен стимулировать клеточный ответ и сам может быть использован как кандидат в вакцины [59]. Например, в работе D.Vatakis et al. включение нуклеотидной последовательности лидерного пептида КС хемокина крысы в состав ДНК-вакцины привело к повышению ее иммуногенности (улучшенным ответам против Т-клеточных эпитопов), что, предположительно, было связано с повышенной секрецией белка и презентацией антигена [60]. С другой стороны, сигнальные последовательности могут приводить и к накоплению белка в тельцах включения, что может быть использовано для получения трудноэкспрессируемых белков в нерастворимой форме. Так, слияние 39aa-сигнального пептида белка *E. coli* TorA с нестабильным hEGF и токсичными SymE-белками человека приводило к их агрегации в работе W.S.Jong et al. [61].

Для прогнозирования безопасности и эффективности применения белков в качестве вакцин, а также возможности их экспрессии в системе *E. coli* была проведена оценка их физико-химических свойств. В работе вычислялись такие

характеристики белков, которые оказывают влияние на их стабильность, растворимость при их экспрессии *in vitro* и применении *in vivo*. Все параметры белков соответствовали критериям отбора. В трех из восьми белков были предсказаны дисульфидные мостики, которые способствуют стабильности третичной и четвертичной структур белков.

Растворимость белков имеет важное значение при производстве вакцинных и терапевтических препаратов. Она зависит от числа гидрофильных групп, величины суммарного заряда, размеров, структуры белков, параметров среды и других факторов. В данной работе растворимость белков при экспрессии в *E. coli* вычислялась в двух программах, которые дали разные результаты. В большинстве случаев предпочтительно получать рекомбинантные белки в растворимой форме, однако для некоторых нестабильных и токсичных белков целесообразна их продукция в тельцах включения [61, 62]. С другой стороны, существуют эффективные методы повышения растворимости белков (изменение концентрации индукторов, времени индукции, температуры и внесение дополнительных компонентов в среду). Например, S.Ghosh et al. было обнаружено, что присутствие от 100 мМ до 1 М дипептида глицилглицина в среде значительно увеличивает растворимость экспрессированных белков (до 170 раз). Применение ими этого метода привело к повышению солюбилизации трудноэкспрессируемых микобактериальных белков при их получении в экспрессионной системе *E. coli* [63].

Незаменимые (основные), жизненно важные для патогена, белки определялись на сайте Центра биоинформатики Тяньцзиньского университета (<http://www.essentialgene.org/>) с помощью BLASTr и базы данных DEG. DEG хранит записи доступных в настоящее время основных геномных элементов (таких как гены, кодирующие белки, и некодирующие РНК) бактерий, архей и эукариот. Среди отобранных на предыдущих этапах 8 иммунодоминантных белков бруцелл только для WP_002966739.1 (LptD) была выявлена достоверная гомология с незаменимыми белками из базы данных DEG, следовательно, только его можно расценивать как белок, необходимый для выживания бруцелл, т.е. экспрессирующийся при любой стадии и форме бруцеллеза. База DEG постоянно обновляется, поэтому при появлении новых ее версий возможно выявление большего числа гомологов незаменимых белков среди выбранных кандидатов.

Геном рода *Brucella* высоко консервативен (все виды бруцелл имеют более 90% генетического сходства) и включает в себя растущее число видов (в настоящее время известно по крайней мере 12). Для человека наиболее патогенными считаются *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* и *B. canis*. Кроме того, показано, что заболевание у людей могут вызывать также *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. inopinata* и недавно выделенный из лягушки вид *Brucella* sp. BO3 (NCBI:txid2691913) [64–66]. Анализ локального выравнивания гена белка *lptD* показал, что выбранный ген консервативен для 5 видов бруцелл, патогенных для человека, а следовательно, белок LptD может быть использован в разработке вакцин против бруцеллеза.

Бруцеллезный LptD (ЛПС-сборочный белок внешней мембраны LptD, или органический белок толерантности к растворителям OstA) принадлежит к семейству LptD. В базе данных семейств белковых доменов Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) на его С-конце определен консервативный домен «транспорт-

ной системы ЛПС D» (в позиции 308–723aa (Pfam:PF04453)) [67]. В это семейство также входят хорошо изученные белки LptD, обнаруженные у других грамотрицательных бактерий (*S. flexneri*, *Y. pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* и др.). Структурный анализ данных белков показывает, что они образуют 26-тяжевые β-цилиндры, которые формируют с LptE архитектуру по типу «бочонка и пробки» для транспорта ЛПС. Согласно данным сервера геной онтологии (The Gene Ontology/GO, <http://geneontology.org/>), LptD участвует в таких жизненно важных биологических процессах, как сборка внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий (GO:0043165), транспорт ЛПС (GO:0015920), а также осуществляет реакцию на органическое вещество (GO:0010033) [38]. Таким образом, LptD является наиболее перспективным кандидатом для разработки эффективных вакцин против бруцеллеза [68–70].

Несмотря на логичность и обоснованность подхода ОВ, только экспериментальные данные можно рассматривать как надежный источник информации об эффективности вакцинного препарата. Вакцинный потенциал многих из анализируемых в работе белков уже был ранее исследован *in vitro* и *in vivo*: в частности, белков внешней мембраны Omp2b, Omp16, Omp19, Omp22, Omp25, Omp25c и OmpW, флагеллинов FlcC и FlgK, гем-транспортера BhuA, ЛПС-сборочного белка LptD, нуклеозид дифосфаткиназы Ndk и др. [6, 7, 71–79].

Более того, некоторые бруцеллезные белки обладают адьювантными свойствами. Например, Pasquevich K.A., Li J.Y. et al. показали, что рекомбинантные белки *B. abortus* Omp16, Omp19, BLS, BCSP31 являются агонистами Толл-подобных рецепторов (TLR) 2 и 4, стимулируют созревание дендритных клеток, их рекрутирование в лимфатические узлы, увеличивают экспрессию некоторых цитокинов и хемокинов, а также индуцируют адаптивный иммунный ответ типов Th1 и Th17 у мышей [80–82]. Также белки *B. abortus* используются в качестве адьювантов в разрабатываемых вакцинах против цистицеркоза (бруцеллезный белок BLS), сальмонеллеза (U-Omp19) и HPV-16 L1VLP (ЛПС) у мышей [81–83]. Также адьювантная способность флагеллинов, стимулирующих врожденный иммунитет через активацию TLR5, продемонстрирована во многих исследованиях [84, 85].

Включение в состав мультиантигенных вакцин хорошо изученных белков, в том числе обладающих адьювантными свойствами, а также «новых», вычисленных с помощью методов биоинформатики, антигенов может стать ключом к созданию эффективной вакцины против бруцеллеза.

Согласно проведенным расчетам, кроме соответствующего всем критериям отбора белка LptD, высоким вакцинным потенциалом против бруцеллеза могут также обладать такие белки, как WP_002964462.1 (BhuA), WP_002965367.1 (Omp25d), WP_002965368.1 (Omp25c), WP_002967184.1 (FlgH), WP_002966644.1 (FlgE), WP_002969598.1 (AlgEfp) и WP_002963597.1 (MliCfp).

Заключение

В настоящем исследовании был проведен биоинформатический анализ 45 предсказанных поверхностных белков бруцелл с использованием 24 компьютерных программ и

нескольких баз данных с целью выявления наиболее перспективных кандидатов для вакцин. По данным анализа *in silico* наибольшим потенциалом в качестве вакцинного препарата против бруцеллеза обладает ЛПС-сборочный белок внешней мембраны бруцелл LptD. Валидация иммуногенных свойств рекомбинантных иммунодоминантных белков бруцелл и их эпитопов (в составе мультиэпитопных вакцин) *in vivo* будет являться целью дальнейших исследований.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 3.1.2.

Financial support

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 3.1.2.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Author declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

1. Бруцеллёз. Современное состояние проблемы. Под ред. Г.Г.Онищенко, А.Н.Куличенко. Ставрополь: ООО «Губерния»; 2019, 336 с. / Brucellosis. The current state of the problem. Edited by Onishchenko GG, Kulichenko AN. Stavropol: "Gubernia" Publ., 2019, 336 p. (In Russian).
2. Воробьев АА, Егорова НБ, Захарова НС, Курбатова ЕА, Семенов БФ, и др. Прогноз в области создания вакцин нового поколения для вакцинопрофилактики и вакцинотерапии инфекционных и неинфекционных болезней. Пульмонология. 2005;(6):15-36. DOI: 10.18093/0869-0189-2005-0-6-15-36 / Vorobyev AA, Egorova NB, Zakharova NS, Kurbatova EA, Semenov BF, et al. Prognosis of development of future vaccine generations for prevention and therapy of infectious and non-infectious diseases. Pulmonologiya. 2005;(6):15-36. DOI: 10.18093/0869-0189-2005-0-6-15-36 (In Russian).
3. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. J Vet Sci. 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
4. Дятлова ВИ. Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2019;4(4):29-41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41 / Dyatlova VI Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines. Bacteriology. 2019;4(4):29-41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41 (In Russian).
5. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. Clin Dev Immunol. 2012;2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493
6. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS One. 2011 Jan 14;6(1):e16203. DOI: 10.1371/journal.pone.0016203
7. Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells *in vivo*, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. J Immunol. 2010 May 1;184(9):5200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.0902209
8. Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19+rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. Mol Immunol. 2016 Mar;71:34-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.01.001
9. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. DNA Cell Biol. 2007 Jun;26(6):435-43. DOI: 10.1089/dna.2006.0552
10. María RR, Arturo CJ, Alicia JA, Paulina MG, Gerardo AO. The Impact of Bioinformatics on Vaccine Design and Development. Vaccines. InTech. 2017. DOI: 10.5772/intechopen.69273
11. Rappuoli R, De Gregorio E, Del Giudice G, Phogat S, Pecetta S, Pizza M, Hanon E. Vaccinology in the post-COVID-19 era. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jan 19;118(3):e2020368118. DOI: 10.1073/pnas.2020368118
12. Massignani V, Pizza M, Moxon ER. The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. Front Immunol. 2019 Apr 16;10:751. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00751
13. Pizza M, Scarlato V, Massignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science. 2000 Mar 10;287(5459):1816-20. DOI: 10.1126/science.287.5459.1816
14. Vernikos G, Medini D. Bexsero® chronicle. Pathog Glob Health. 2014 Oct;108(7):305-16. DOI: 10.1179/2047773214Y.0000000162
15. Mbaeyi SA, Bozio CH, Duffy J, Rubin LG, Hariri S, Stephens DS, MacNeil JR. Meningococcal Vaccination: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2020. MMWR Recomm Rep. 2020 Sep 25;69(9):1-41. DOI: 10.15585/mmwr.rr6909a1
16. Bibi S, Ullah I, Zhu B, Adnan M, Liaqat R, Kong WB, Niu S. In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. Sci Rep. 2021 Jan 13;11(1):1249. DOI: 10.1038/s41598-020-80899-6
17. Leow CY, Kazi A, Hisyam Ismail CMK, Chuah C, Lim BH, Leow CH, et al. Reverse vaccinology approach for the identification and characterization of outer membrane proteins of *Shigella flexneri* as potential cellular- and antibody-dependent vaccine candidates. Clin Exp Vaccine Res. 2020 Jan;9(1):15-25. DOI: 10.7774/cevr.2020.9.1.15
18. Meunier M, Guyard-Nicodème M, Hirschaud E, Parra A, Chemaly M, Dory D. Identification of Novel Vaccine Candidates against *Campylobacter* through Reverse Vaccinology. J Immunol Res. 2016;2016:5715790. DOI: 10.1155/2016/5715790
19. Shahid F, Ashraf ST, Ali A. Reverse Vaccinology Approach to Potential Vaccine Candidates Against *Acinetobacter baumannii*. Methods Mol Biol. 2019;1946:329-336. DOI: 10.1007/978-1-4939-9118-1_29
20. Soltan MA, Magdy D, Solyman SM, Hanora A. Design of *Staphylococcus aureus* New Vaccine Candidates with B and T Cell Epitope Mapping, Reverse Vaccinology, and Immunoinformatics. OMICS. 2020 Apr;24(4):195-204. DOI: 10.1089/omi.2019.0183
21. Enayatkhani M., Hasaniazad M., Faezi S., Gouklani H., Davoodian P, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2021,39(8):2857-72. DOI: 10.1080/07391102.2020.1756411
22. Ong E, Wong MU, Huffman A, He Y. COVID-19 Coronavirus Vaccine Design Using Reverse Vaccinology and Machine Learning. Front Immunol. 2020 Jul 3;11:1581. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01581
23. Eftekhari MG. Prediction of protein subcellular localization using deep learning and data augmentation. bioRxiv 2020.05.19.068122. DOI: 10.1101/2020.05.19.068122
24. Lau WYV, Hoad GR, Jin V, Winsor GL, Madyan A, Gray KL, et al. PSORTdb 4.0: expanded and redesigned bacterial and archaeal protein subcellular localization database incorporating new secondary localizations. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D803-D808. doi: 10.1093/nar/gkaa1095

25. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*. 2006 Aug 15;64(3):643-51. DOI: 10.1002/prot.21018
26. He Y, Xiang Z, Mobley HL. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:297505. DOI: 10.1155/2010/297505
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
28. Shende G, Haldankar H, Barai RS, Bharmal MH, Shetty V, Idicula-Thomas S. PBIT: Pipeline Builder for Identification of drug Targets for infectious diseases. *Bioinformatics*. 2017 Mar 15;33(6):929-931. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw760
29. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007 Jan 5;8:4. DOI: 10.1186/1471-2105-8-4
30. Garg A, Gupta D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*. 2008 Jan 28;9:62. DOI: 10.1186/1471-2105-9-62.
31. Gupta A, Kapil R, Dhakan DB, Sharma VK. MP3: a software tool for the prediction of pathogenic proteins in genomic and metagenomic data. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93907. DOI: 10.1371/journal.pone.0093907
32. Ong E, Wang H, Wong MU, Seetharaman M, Valdez N, He Y. Vaxign-ML: supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. *Bioinformatics*. 2020 May 1;36(10):3185-3191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa119
33. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v.2--a server for *in silico* prediction of allergens. *J Mol Model*. 2014 Jun;20(6):2278. DOI: 10.1007/s00894-014-2278-5
34. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016 Feb 15;32(4):511-7. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv639
35. Hisham Y, Ashhab Y, Hwang SH, Kim DE. Identification of Highly Conserved SARS-CoV-2 Antigenic Epitopes with Wide Coverage Using Reverse Vaccinology Approach. *Viruses*. 2021 Apr 28;13(5):787. DOI: 10.3390/v13050787.
36. Jensen KK, Andreatta M, Marcantili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018 Jul;154(3):394-406. DOI: 10.1111/imm.12889
37. Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, Keşmir C, Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol*. 2013 Oct;9(10):e1003266. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003266
38. Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D1049-56. DOI: 10.1093/nar/gku1179
39. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D605-D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2021 Oct 11;49(18):10800.
40. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1998;6:175-82.
41. Hayat S, Peters C, Shu N, Tsigirigos KD, Elofsson A. Inclusion of dyad-repeat pattern improves topology prediction of transmembrane β -barrel proteins. *Bioinformatics*. 2016 May 15;32(10):1571-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw025
42. Ong E, Wong MU, He Y. Identification of New Features from Known Bacterial Protective Vaccine Antigens Enhances Rational Vaccine Design. *Front Immunol*. 2017 Oct 26;8:1382. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01382
43. Almagro Armenteros JJ, Tsigirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019 Apr;37(4):420-423. DOI: 10.1038/s41587-019-0036-z
44. Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gislason MH, Pihl SI, et al. SignalP 6.0 achieves signal peptide prediction across all types using protein language models. *bioRxiv* 2021.06.09.447770. DOI: 10.1101/2021.06.09.447770
45. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3784-8. DOI: 10.1093/nar/gkg563
46. Ferré F, Clote P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W182-5. DOI: 10.1093/nar/gkl189
47. Magnan CN, Randall A, Baldi P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*. 2009 Sep 1;25(17):2200-7. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp386
48. Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*. 2017 Oct 1;33(19):3098-3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345
49. Luo H, Lin Y, Gao F, Zhang CT, Zhang R. DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D574-80. DOI: 10.1093/nar/gkt1131.
50. Малхазова СМ, Миронова ВА, Пестина ПВ, Орлов ДС. Новые и возвращающиеся инфекции в России: медико-географический аспект. *Вестник Московского университета. Серия 5, География*. 2016;5:24-32. / Malkhazova SM, Mironova VA, Pestina PV, Orlov DS. Emerging and re-emerging infections in Russia: a medico-geographical aspect. *Moscow University Bulletin. Series 5, Geography*. 2016;5:24-32. (In Russian).
51. Haider N, Rothman-Ostrow P, Osman AY, Arruda LB, Macfarlane-Berry L, Elton L, et al. COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease? COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease? *Front Public Health*. 2020 Nov 26;8:596944. DOI: 10.3389/fpubh.2020.596944
52. Dorneles EM, Teixeira-Carvalho A, Araújo MS, Sriranganathan N, Lage AP. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*. 2015 Jul 17;33(31):3659-66. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057
53. Zhang P. Autoantibodies and anti-microbial antibodies: Homology of the protein sequences of human autoantigens and the microbes with implication of microbial etiology in autoimmune diseases. *BioRxiv* 403519. DOI: 10.1101/403519
54. Оганезова ИА. Кишечная микробиота и иммунитет: иммуномодулирующие эффекты *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PMЖ*. 2018;9:39-44. / Oganezova IA. Intestinal microbiota and immunity: immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2018;9:39-44. (In Russian).
55. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017 May 16;474(11):1823-1836. DOI: 10.1042/BCJ20160510
56. Dey AK, Malyala P, Singh M. Physicochemical and functional characterization of vaccine antigens and adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2014 May;13(5):671-85. DOI: 10.1586/14760584.2014.907528
57. Halling-Brown M, Sansom CE, Davies M, Titball RW, Moss DS. Are bacterial vaccine antigens T-cell epitope depleted? *Trends Immunol*. 2008 Aug;29(8):374-9. DOI: 10.1016/j.it.2008.06.001
58. Low KO, Jonet MA, Ismail NF, Illias RM. Optimization of a *Bacillus* sp signal peptide for improved recombinant protein secretion and cell viability in *Escherichia coli*: Is there an optimal signal peptide design? *Bioengineered*. 2012 Nov-Dec;3(6):334-8. DOI: 10.4161/bioe.21454
59. Kovjazin R, Carmon L. The use of signal peptide domains as vaccine candidates. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(9):2733-40. DOI: 10.4161/21645515.2014.970916
60. Vataki D, McMillan M. The signal peptide sequence impacts the immune response elicited by a DNA epitope vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Oct;18(10):1776-80. DOI: 10.1128/CVI.05179-11

61. Jong WS, Vikström D, Houben D, van den Berg van Saparoea HB, de Gier JW, Luijck J. Application of an *E. coli* signal sequence as a versatile inclusion body tag. *Microb Cell Fact*. 2017 Mar 21;16(1):50. DOI: 10.1186/s12934-017-0662-4
62. Diaz AA, Tomba E, Lennarson R, Richard R, Bagajewicz MJ, Harrison RG. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnol Bioeng*. 2010 Feb 1;105(2):374-83. DOI: 10.1002/bit.22537
63. Ghosh S, Rasheedi S, Rahim SS, Banerjee S, Choudhary RK, Chakhaiyar P, Ehtesham NZ, Mukhopadhyay S, Hasnain SE. Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques*. 2004 Sep;37(3):418, 420, 422-3. DOI: 10.2144/04373ST07
64. Rajendhran J. Genomic insights into *Brucella*. *Infect Genet Evol*. 2021 Jan;87:104635. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104635
65. Rouzic N, Desmier L, Cariou ME, Gay E, Foster JT, Williamson CHD, et al. First Case of Brucellosis Caused by an Amphibian-type *Brucella*. *Clin Infect Dis*. 2021 May 4;72(9):e404-e407. DOI: 10.1093/cid/ciaa1082
66. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis*. 2003 Apr;9(4):485-8. DOI: 10.3201/eid0904.020576
67. Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(D1):D290-D301. DOI: 10.1093/nar/gkr1065
68. Botos I, Majdalani N, Mayclin SJ, McCarthy JG, Lundquist K, Wojtowicz D, et al. Structural and Functional Characterization of the LPS Transporter LptDE from Gram-Negative Pathogens. *Structure*. 2016 Jun 7;24(6):965-976. DOI: 10.1016/j.str.2016.03.026
69. Dong H, Xiang Q, Gu Y, Wang Z, Paterson NG, Stansfeld PJ, He C, Zhang Y, Wang W, Dong C. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature*. 2014 Jul 3;511(7507):52-6. DOI: 10.1038/nature13464
70. Zha Z, Li C, Li W, Ye Z, Pan J. LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Sci Rep*. 2016 Dec 6;6:38577. DOI: 10.1038/srep38577
71. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Jul;14(7):869-74. DOI: 10.1128/CVI.00472-06
72. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol*. 2012 Jun;51(2):159-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.02.126
73. Golshani M, Rafati S, Nejati-Moheimani M, Ghasemian M, Bouzari S. Comparison of potential protection conferred by three immunization strategies (protein/protein, DNA/DNA, and DNA/protein) against *Brucella* infection using Omp2b in BALB/c Mice. *Vet Microbiol*. 2016 Dec 25;197:47-52. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.10.027
74. Gomez G, Pei J, Mwangi W, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Immunogenic and invasive properties of *Brucella melitensis* 16M outer membrane protein vaccine candidates identified via a reverse vaccinology approach. *PLoS One*. 2013;8(3):e59751. DOI: 10.1371/journal.pone.0059751
75. Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Min W, Lee HJ, et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. *Vaccine*. 2018 May 17;36(21):3027-3033. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.04.019
76. Paul S, Peddayalachagiri BV, Nagaraj S, Kingston JJ, Batra HV. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model. *Mol Immunol*. 2018 Jul;99:9-18. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.04.002
77. Paultey JT, Anderson ES, Roop RM 2nd. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5248-54. DOI: 10.1128/IAI.00460-07
78. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Azizi M, Bouzari S. Mannosylated chitosan nanoparticles loaded with FliC antigen as a novel vaccine candidate against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. *J Biotechnol*. 2020 Feb 20;310:89-96. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.01.016
79. Vishnu US, Sankarasubramanian J, Gunasekaran P, Rajendhran J. Novel Vaccine Candidates against *Brucella melitensis* Identified through Reverse Vaccinology Approach. *OMICS*. 2015 Nov;19(11):722-9. DOI: 10.1089/omi.2015.0105
80. Li JY, Liu Y, Gao XX, Gao X, Cai H. TLR2 and TLR4 signaling pathways are required for recombinant *Brucella abortus* BCSP31-induced cytokine production, functional upregulation of mouse macrophages, and the Th1 immune response *in vivo* and *in vitro*. *Cell Mol Immunol*. 2014 Sep;11(5):477-94. DOI: 10.1038/cmi.2014.28
81. Risso GS, Carabajal MV, Bruno LA, Ibañez AE, Coria LM, Pasquevich KA, et al. U-Omp19 from *Brucella abortus* Is a Useful Adjuvant for Vaccine Formulations against *Salmonella* Infection in Mice. *Front Immunol*. 2017 Feb 17;8:171. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00171
82. Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(5):1277-86. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.006
83. Kianmehr Z, Soleimanjahi H, Ardestani SK, Fotouhi F, Abdoli A. Influence of *Brucella abortus* lipopolysaccharide as an adjuvant on the immunogenicity of HPV-16 L1VLP vaccine in mice. *Med Microbiol Immunol*. 2015 Apr;204(2):205-13. DOI: 10.1007/s00430-014-0356-z
84. Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2018 Apr;17(4):335-349. DOI: 10.1080/14760584.2018.1457443
85. Hajam IA, Dar PA, Shah Nawaz I, Jaime JC, Lee JH. Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017 Sep 1;49(9):e373. DOI: 10.1038/emmm.2017.172

Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*

М.А.Шкуратова¹, М.А.Марьин¹, М.М.Рогозин¹, А.К.Сурин¹, Л.В.Коломбет¹, В.В.Фирстова^{1,2}

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

²ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт», Пушкино, Московская область, Российская Федерация

В работе представлены результаты оптимизации метода получения шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2), продуцируемых некоторыми штаммами кишечной палочки, которые обозначают аббревиатурой STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*). Для экспрессии белка использовали штамм *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, который содержит дополнительные копии генов, редких для *E. coli* тРНК, что обеспечивает эффективную трансляцию Stx-белков. Культивирование проводили при пониженной температуре в среде для аутоиндукции ZYM-5052. В результате Stx-белки экспрессировались в цитоплазму в растворимой форме. После очистки белков методом аффинной хроматографии на колонке с никелевым сорбентом конечный выход рекомбинантных субъединиц шига-токсинов составлял приблизительно 1,7 мг/л для rStx1A; 1,9 мг/л для rStx2A; 2,5 мг/л для rStx1B и 2,7 мг/л для rStx2B. С использованием масс-спектрометрического анализа подтвердили идентичность полученных белков и определили наиболее часто повторяющиеся последовательности протеинов rStx1A, rStx2A, которые могут быть использованы при разработке базы для экспресс-идентификации шига-токсинов.

Ключевые слова: шига-токсин, масс-спектрометрия, рекомбинантные белки, идентификация

Для цитирования: Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Сурин А.К., Коломбет Л.В., Фирстова В.В. Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*. Бактериология. 2021; 6(4): 30–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38

Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*

М.А.Shkuratova¹, М.А.Maryin¹, М.М.Rogozin¹, А.К.Surin¹, Л.В.Kolombet¹, V.V.Firstova^{1,2}

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

²Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

The paper presents the results of optimization of the method for obtaining shiga toxins of the first and second types (Stx1 and Stx2), produced by some strains of *Escherichia coli* (STEC). For protein expression, the *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain was used, which contains additional copies of genes rare for *E. coli* tRNA, which ensures efficient translation of Stx proteins. The cultivation was carried out at a reduced temperature in a medium for autoinduction ZYM-5052. As a result, Stx proteins were expressed in the cytoplasm in a soluble form. After purification of proteins by affinity chromatography on a column with a nickel sorbent, the final yield of recombinant shiga toxin subunits was approximately 1.7 mg/L for rStx1A; 1.9 mg/L for rStx2A; 2.5 mg/L for rStx1B and 2.7 mg/L for rStx2B. Using mass-spectrometric analysis, the identity of the obtained proteins was confirmed and the most frequently repeated sequences of proteins rStx1A, rStx2A, which can be used in the development of a base for the rapid identification of shiga-toxins, were determined.

Key words: shiga-toxin, mass-spectrometry, recombinant proteins, identification

For citation: Shkuratova M.A., Maryin M.A., Rogozin M.M., Surin A.K., Kolombet L.V., Firstova V.V. Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*. Bacteriology. 2021; 6(4): 30–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38

Для корреспонденции:

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии 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) 31-1915
E-mail: maria_shkuratova@mail.ru

Статья поступила 03.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1915
E-mail: maria_shkuratova@mail.ru

The article was received 03.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

Бактерии *Escherichia coli*, продуцирующие шига-токсин (STEC), являются причиной развития серьезных заболеваний, сопровождающихся лихорадкой, рвотой, кровавой диареей [1]. Под влиянием шига-токсинов (Stx) развивается геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром, что в итоге может привести к летальному исходу [2]. Шига-токсины являются основными факторами патогенности STEC штаммов. Они подразделяются на два класса – Stx1 и Stx2 [3]. Шига-токсины относятся к АВ-токсинам и представляют собой двухкомпонентные белковые комплексы. Молекулярная масса шига-токсинов составляет около 70 кДа, из которой 32 кДа составляет субъединица А, а 38 кДа – 5 идентичных субъединиц В, каждая из которых имеет массу 7,7 кДа [4]. Субъединица А представляет собой ферментативно-активную N-гликозидазу, способную ингибировать синтез белка путем отщепления аденинового основания в положении 4324 от 28S рРНК эукариотической рибосомной 60S-субъединицы, что приводит к гибели клетки. В-пентамер содержит множество сайтов связывания рецепторов для глоботриаозилцерамида (Gb3) или глоботетраозилцерамида (Gb4), экспрессируемых на поверхности эукариотических клеток [5]. Несмотря на структурное сходство, Stx1 и Stx2 обнаруживают значительные различия в биологической активности. Эпидемиологические исследования и исследования молекулярного типирования показывают, что штаммы STEC, продуцирующие Stx2, более тесно связаны с гемолитико-уремическим синдромом, чем штаммы STEC, продуцирующие Stx1 [6].

Для своевременного выявления шига-токсинов в окружающей среде или в биологических средах необходима разработка высокочувствительных методов детекции данных белков [3]. В качестве такого метода может выступать масс-спектрометрический анализ. При разработке эффективных методов детекции шига-токсинов необходимо прежде всего получить рекомбинантные белки. Белки Stx могут быть получены в прокариотической системе – метод является рутинным и хорошо отработан. Однако для обеспечения высокого выхода белка с сохранением его функциональных характеристик необходимо получить белок в растворенной форме.

Цель исследования – разработать оптимальный метод получения субъединиц рекомбинантных белков шига-токсинов Stx1 и Stx2 STEC и с использованием методов масс-спектрометрии подтвердить их идентичность и чистоту.

Материалы и методы

Конструирование плазмид экспрессии. ДНК бактериального штамма *E. coli* O157:H7 (№6098) использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации генов шига-токсина 1 и 2. ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом для грамотрицательных бактерий. До выделения очищенной ДНК все манипуляции с культурой проводили в условиях 2-го уровня биобезопасности. Каждую субъединицу амплифицировали отдельно с помощью специфических праймеров, которые перечислены в табл. 1. Прямым праймером на N-конец всех белков вводили дополнительную аминокислоту серин. Обратным праймером на 3'-конец ДНК добавляли стоп-кодон ТАА.

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации субъединиц шига-токсинов

№	Название	Последовательность, 5'-3'	Длина	Предназначение
1	1AFor	TCCAAGGAATTTACCTTAGACTTC	24	Амплификация гена stx1A
2	1ARev	TTAACTGCTAATAGTTCTGCGCA	23	
3	2AFor	TCCCGGGAGTTTACGATAGACTTT	24	Амплификация гена stx2A
4	2ARev	TTATTTACCCGTTGTATATAAAAAC	25	
5	1BFor	TCCACGCCTGATTGTGTAAGTGG	23	Амплификация гена stx1B
6	1BRev	TTAACGAAAAATAACTTCGCTGAATC	26	
7	1BFor	TCCGCGGATTGTGCTAAAGGT	21	Амплификация гена stx2B
8	1BRev	TTAGTCATTATTAAGTGCCTTC	24	

Для ПЦР использовали высокоточную ДНК-полимеразу PhusionHotStartII (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (BioRad, США) В реакцию вносили 200 нг тотальной ДНК *E. coli* O157:H7 в качестве матрицы и запускали амплификацию при следующих параметрах: первоначальная денатурация в течение 1 мин при 98°C, далее 30 циклов: 10 с при 98°C, 15 с при 55°C и 1 мин при 72°C. Финальная элонгация длилась 2 мин. Затем продукты реакций очищали от полимеразы при помощи микроцентрифужных колонок QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). У полученных ДНК наращивали одиночные 3'-остатки дезоксиаденозина (А) с помощью Taq-полимеразы в присутствии dATP и снова очищали на колонках QIAquick.

Далее гены субъединиц шига-токсинов первого и второго типов клонировали в вектор pET SUMO с помощью набора Champion pETSUMO Protein Expression System (Invitrogen, США) по технологии TA-клонирования. Введение плазмид в химически компетентные клетки *E. coli* OneShot Mach1-T1R (Invitrogen) проводили по протоколу, описанному в руководстве. Затем проводили скрининг отдельных колоний методом ПЦР для анализа наличия вставок и их верной ориентации в векторе. Колонии амплифицировали с помощью Taq ДНК-полимеразы и соответствующих вставке генспецифических прямых праймеров (1AFor, 2AFor, 1BFor, 2BFor) и обратного праймера, отжигающегося в области T7-терминатора T7 Reverse (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'), при следующих условиях: первоначальная денатурация в течение 3 мин при 95°C с последующими 23 циклами по 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. По результатам анализа отбирали клоны, которые использовали при проведении дальнейшей работы. Полученные плазмиды получили обозначение pET SUMO-stx1A, pET SUMO-stx1B, pET SUMO-stx2A, pET SUMO-stx2B.

Секвенирование плазмидной ДНК выполнила компания ЗАО «Евроген Ру» (Москва, РФ). Анализ полученных результатов для подтверждения корректности встраивания последовательностей экспрессионных конструкторов производили по алгоритму BLAST.

Экспрессия и очистка белка. Отобранные плазмиды встраивали посредством электротрансформации в электрокомпетентные микробные клетки *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen, США).

Таблица 2. Идентифицированные пептиды белка rStx1A методом тандемной масс-спектрометрии

Peptide	Uniq	Score, %	Mass	Length
V.DVRGIDPEEGRFN.N	Y	100,0	1502,7113	13
R.GIDPEEGRFN.N	Y	99,9	1132,5149	10
D.VRGIDPEEGRFN.N	Y	99,9	1387,6843	12
V.DVRGIDPEEGR.F	Y	99,9	1241,6000	11
V.DVRGIDPEEGRF.N	Y	99,9	1388,6683	12
R.GIDPEEGRF.N	Y	99,9	1018,4719	9
F.RTTLDDLSGR.S	Y	99,9	1132,5836	10
R.FADFSHVTFPGTT.A	Y	99,9	1425,6565	13
L.M(+15.99)IDSGTGDNL.F.A	Y	99,9	1184,5020	11
F.SHVTFPGTT.A	Y	99,9	945,4556	9
F.SHVTFPGT.T	Y	99,9	844,4079	8
D.PEEGRFN.N	Y	99,9	847,3824	7
V.RGIDPEEGRFN.N	Y	99,9	1288,6160	11
A.SDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGR.V	Y	99,9	1483,5708	13
R.TTLDDLSGR.S	Y	99,9	976,4825	9
R.QIQRGF.R	Y	99,9	747,4028	6
S.HVTFPGTT.A	Y	99,9	858,4236	8
R.GIDPEEGR.F	Y	99,9	871,4035	8
Y.RFADFSHV.T	Y	99,9	977,4719	8
R.TGM(+15.99)QINR.H	Y	99,9	834,4018	7
L.FAVDVR.G	Y	99,9	705,3809	6
F.SHVTFPGTTA.V	Y	99,9	1016,4927	10
R.M(+15.99)ASDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGR.V	Y	99,9	1701,6433	15
T.LDDLSGR.S	Y	99,9	774,3871	7
S.VLPDYHGQ.D	Y	99,9	927,4450	8
L.M(+15.99)IDSGTGDNL.F	Y	99,9	1037,4336	10
L.LM(+15.99)IDSGTGDNL.F	Y	99,9	1150,5176	11
F.RTTLDDL.S	Y	99,8	832,4290	7
L.RFRQIQ.R.G	N	99,8	1002,5835	7
L.LM(+15.99)IDSGTGDNL.F.A	Y	99,8	1297,5861	12
G.IDPEEGRFN.N	Y	99,8	1075,4934	9
Y.VDSLNVIR.S	Y	99,8	914,5185	8
F.SHVTFPG.T	Y	99,7	743,3602	7

Штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущие экспрессионные плазмиды pET SUMO-stx1A, pET SUMO-stx1B, pET SUMO-stx2A, pET SUMO-stx2B, выращивали в питательной среде для автоиндукции ZYM-5052 [7], содержащей 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола.

Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих по 200–250 мл среды в каждой, при вращении на ротационном шейкере (200 об./мин) в течение 24 ч при температуре культивирования 30°C. Собранные центрифугированием осадки клеток замораживали для хранения в кельвинаторе при 80°C.

Бактериальные осадки ресуспендировали в буфере А, содержащем 25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 0,2% твин-20 и 2% глицерина. Клетки лизировали и проводили мягкую

Таблица 2. Окончание

I.DPEEGRF.N	Y	99,6	848,3664	7
F.ADFSHV.T	Y	99,4	674,3024	6
H.NKILW.D	Y	99,4	672,3959	5
L.NWGRLS.S	N	99,4	731,3715	6
R.VAGISR.T	Y	99,2	601,3547	6
Q.DSVRVG.R	Y	99,2	631,3289	6
F.NNLRLIV.E	Y	97,7	840,5181	7
Q.DSVRVGR.I	Y	97,5	787,4301	7
Y.LDLM(+15.99)SH.S	Y	97,4	730,3320	6
D.SLNVIR.S	Y	97,4	700,4232	6
L.RLIVE.R	Y	96,4	628,3908	5
F.YRFADF.S	Y	96,4	817,3759	6
Y.RFADF.S	Y	96,2	654,3125	5
L.NWGRL.S	N	96,2	644,3394	5
R.FRQIQ.R.G	N	92,0	846,4824	6
Y.TTLQR.V	N	90,7	617,3497	5
F.RQIQ.R.G	N	90,3	699,4140	5
L.RLIVER.N	Y	90,3	784,4919	6
R.LIVER.N	Y	89,9	742,4337	6
R.LIVER.N	Y	89,9	628,3908	5
F.NNLRL.I	Y	89,8	628,3657	5
M.LRFVT.V	N	86,0	634,3802	5
R.M(+15.99)ASDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGRVR.G	Y	86,0	1956,8127	17
R.FRQIQ.R	N	85,8	690,3813	5
A.SDEFFPSM(+15.99)C(+57.02)PADGRVR.G	Y	85,0	1738,7402	15
S.SVLPDYHGQ.D	Y	84,1	1014,4771	9
N.NLRLIV.E	Y	83,4	726,4752	6
M.TAEDVDTL.N	Y	79,5	975,4760	9
L.RFRQIQ.R	N	74,6	846,4824	6
E.ALRF.R.Q	N	73,8	661,4023	5
Y.RFADFS.H	Y	63,8	741,3445	6
L.RLIVER.N	Y	50,9	898,5348	7
T.TSYLDLMS.H	Y	46,2	928,4212	8
T.AVTLGSDSSYT.T	Y	33,2	1099,5033	11

Y – уникальные пептиды, N – не уникальные пептиды.

обработку ультразвуком (Bandelin SONOPULS HD 2200, Германия) на льду до полного разрушения клеток. Клеточный дебрис осаждали на центрифуге при 48000 g в течение 15 мин, 4°C.

Очистку целевых белков из осветленных лизатов проводили с использованием хроматографа Amersham Biosciences ÅKTA FPLC (Швеция).

Осветленный лизат наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку с сорбентом cOmpete His-Tag (Roche, Швейцария). Проскок собирали и отбирали пробу для анализа. Белки элюировали буфером Б: 25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 200 мМ имидазола, 0,2% твин-20 и 2% глицерина. Пиковые фракции анализировали с помощью вертикального электрофореза в 10–12%-м полиакриламид-

Таблица 3. Идентифицированные пептиды белка rStx2A методом tandemной масс-спектрометрии

Peptide	Uniq	Score, %	Mass	Length
S.VINHTPPGSYF.A	Y	99,9	1230,6033	11
R.ISNVLPEYR.G	Y	99,9	1089,5818	9
R.ISNVLPEYRGEDGVR.V	Y	99,9	1702,8638	15
N.VLPEYRGE.D	Y	99,9	961,4869	8
R.ISNVLPEYRG.E	Y	99,9	1146,6033	10
E.YRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1106,5469	10
S.VINHTPPGSY.F	Y	99,9	1083,5349	10
R.ISNVLPEYRGED.G	Y	99,9	1390,6729	12
L.SETAPVYTM(+15.99).T	Y	99,9	1013,4376	9
S.NVLPEYRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1658,8375	15
R.ISNVLPEYRGE.D	Y	99,9	1275,6459	11
R.ISNVLPEYRGEDGVRVGR.I	Y	99,9	2015,0548	18
N.HTPPGSYF.A	Y	99,9	904,4079	8
V.YTM(+15.99)TPGDVDTL.N	Y	99,9	1340,6169	12
A.LSETAPVY.T	Y	99,9	878,4385	8
I.NHTPPGSYF.A	Y	99,9	1018,4508	9
V.YTM(+15.99)TPGDVDTL.L	Y	99,9	1227,5330	11
R.ISNVLPEYRGEDG.V	Y	99,9	1447,6943	13
S.NVLPEYRGE.D	Y	99,9	1075,5298	9
N.VLPEYRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1544,7947	14
R.ISNVLPEYRGEDGVRVG.R	Y	99,9	1858,9536	17
T.M(+15.99)TPGDVDTL.N	Y	99,9	1076,5060	10
F.THISVPGVT.T	Y	99,9	909,4919	9
N.VLPEYR.G	Y	99,9	775,4228	6
E.YRGEDGVR.V	Y	99,9	950,4570	8
S.NVLPEYRGED.G	Y	99,9	1190,5568	10
F.THISVPGVTT.V	Y	99,9	1010,5397	10
A.RFDHLR.L	Y	99,9	842,4511	6
R.GEDGVRVG.R	Y	99,9	787,3824	8
Q.ITGDRPVIK.I	Y	99,8	997,5920	9
E.YRGEDGVRVGR.I	Y	99,8	1262,6479	11
I.NHTPPGSY.F	Y	99,8	871,3824	8
Y.TM(+15.99)TPGDVDTL.N	Y	99,8	1177,5537	11
R.SGM(+15.99)QISR.H	Y	99,8	793,3752	7
R.FDHLRLIIE.Q	Y	99,8	1154,6448	9
Y.FAVDIR.G	Y	99,8	719,3966	6
R.FDHLR.L	Y	99,8	686,3500	5
T.HISVPGVT.T	Y	99,8	808,4443	8
Q.ALSETAPVYT.M	Y	99,8	1050,5233	10
Y.QARFD.H	Y	99,8	635,3027	5
F.SDFTHISVPGVT.T	Y	99,8	1258,6194	12
S.NVLPEYRGEDGVR.V	Y	99,8	1502,7477	13
A.LSETAPVYT.M	Y	99,8	979,4862	9
N.HTPPGSY.F	Y	99,8	757,3395	7
Y.TM(+15.99)TPGDVDTL.L	Y	99,7	1064,4696	10
T.GDRPVIK.I	Y	99,4	783,4603	7
Y.FAVDIRG.L	Y	99,4	776,4180	7

Таблица 3. Окончание

D.FTHISVPGVT.T	Y	99,4	1056,5604	10
N.VLPEYRGEDGVR.V	Y	99,4	1388,7048	12
F.DHLRLIIE.Q	Y	99,4	1007,5764	8
F.YRFSDF.T	Y	99,3	833,3708	6
F.SDFTHI.S	Y	99,3	718,3286	6
L.NWGRIS.N	N	98,9	731,3715	6
L.RLIIEQ.N	Y	98,8	770,4650	6
F.SDFTHIS.V	Y	98,8	805,3606	7
Y.SREFTIDFSTQ.Q	Y	98,6	1329,6201	11
N.VLPEYRGED.G	Y	98,4	1076,5138	9
G.DRPVIK.I	Y	98,2	726,4388	6
A.RFDHLR	Y	98,1	686,3500	5
R.GEDGVRVGR.I	Y	98,1	943,4835	9
V.INHTPPGSY.F	Y	98,0	984,4665	9
R.FRQIQR.E	N	95,5	846,4824	6
S.NVLPEYRGEDG.V	Y	95,3	1247,5781	11
Q.REFRQA.L	Y	94,6	805,4194	6
M.TPGDVDTL.N	Y	94,2	929,4706	9
E.DGVRVG.R	Y	94,0	601,3184	6
L.RFRQIQR.E	N	93,9	1002,5835	7
L.RLIIE.Q	Y	93,7	642,4064	5
A.SRAVLR.F	Y	93,6	700,4344	6
L.RFRQIQR	N	93,6	846,4824	6
V.INHTPPGSYF.A	Y	93,5	1131,5349	10
G.RISFN.N	Y	89,6	635,3391	5
T.M(+15.99)TPGDVDTL.L	Y	89,6	963,4219	9
Y.RFSDF.T	Y	89,2	670,3074	5
F.DHLRL.I	Y	88,0	652,3657	5
A.LSETAPVYTM(+15.99).T	Y	87,2	1126,5216	10
E.YRGEDGVRV.G	Y	86,8	1049,5254	9
R.FRQIQR	N	83,5	690,3813	5
N.SIRTE.I	Y	80,5	604,3180	5
Y.RGEDGVRVG.R	Y	73,4	943,4835	9
P.EYRGEDGVRVG.R	Y	73,2	1235,5894	11
E.DGVRVGR.I	Y	72,6	757,4194	7
A.VLRFV.T	Y	72,2	632,4009	5
R.TEISTPL.E	Y	72,0	759,4014	7
T.GDRPVIK.I.N	Y	72,0	896,5443	8
S.LNSIRT.E	Y	71,2	702,4024	6
E.ALRFV.Q	N	65,6	661,4023	5
R.QIQREFR.Q	Y	62,8	975,5250	7
A.ALERSGM(+15.99)QIS.R	Y	37,3	1106,5389	10
R.ISNVLPEYRGEDGVRV.G	Y	37,0	1801,9323	16
N.VLPEYRGEDG.V	Y	36,4	1133,5353	10
V.TVTAEL.R	N	36,1	703,3752	7
S.NVLPEYRG.E	Y	35,2	946,4872	8
V.NEESQPEC(+57.02)QIT.G	Y	35,0	1333,5457	11
Y.QARFDHLR.L	Y	34,7	1041,5468	8

Y – уникальные пептиды, N – не уникальные пептиды.

ном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с добавлением SDS по методу Лэммли (SDS-PAGE).

Далее проводили гель-фильтрационную очистку на уравновешенной буфером А колонке Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, США) для удаления низкомолекулярных веществ. На основании данных электрофореза определяли фракции, в которых содержались белки интереса.

Полученный раствор белка инкубировали с протеазой SUMO (1 мкг/мл и 10X SUMO Protease Buffer) и DTT (дитиотреитол 1 мкг/мл) при 30°C в течение 2 ч и повторно наносили на колонку с сорбентом cOplete His-Tag. Белки интереса содержались в проскоке. Остаток элюировали буфером Б, содержащим 200 мМ имидазола. Пиковые фракции анализировали с помощью SDS-PAGE в 12–15%-м ПААГ.

Проходную фракцию подвергали диализу против буфера HEPES (50 мМ HEPES, pH 7,0; 150 мМ NaCl, 80 мМ сахарозы) в течение ночи. Чистоту полученных белков анализировали с помощью электрофореза в 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях.

Концентрацию очищенного белка измеряли при помощи спектрофотометра Smart Spec Plus (BioRad Laboratories, США) при длине волны 250–350 нм, используя бычий сывороточный альбумин (BCA) в качестве стандарта.

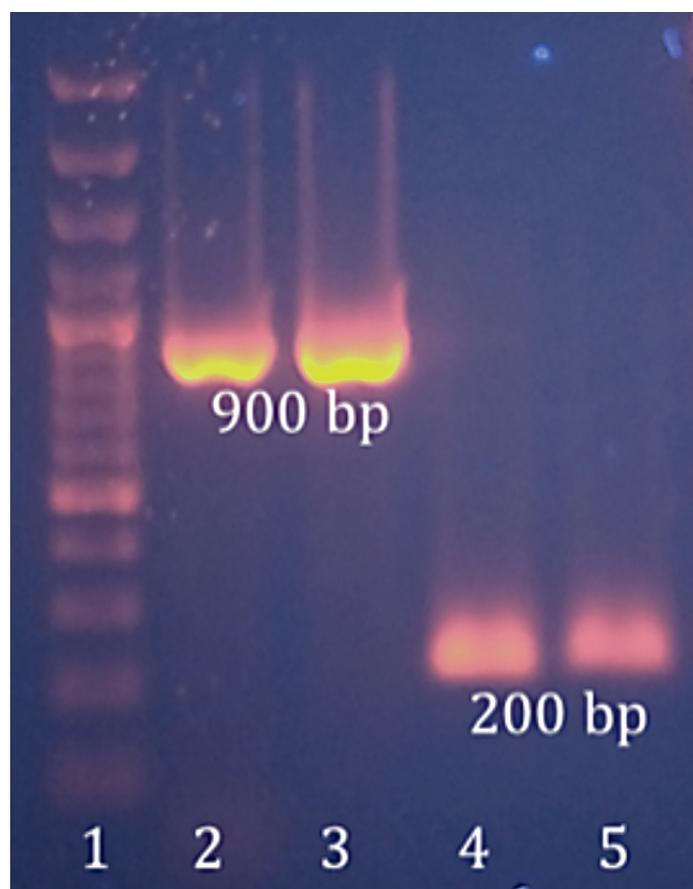


Рис. 1. Амплификация генов субъединиц шига-токсинов *E. coli*: дорожка 1 – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); дорожка 2 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx1A* (желаемая длина ДНК – 879 п.н.); дорожка 3 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx2A* (желаемая длина ДНК – 891 п.н.); дорожка 4 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx1B* (желаемая длина ДНК – 207 п.н.); дорожка 5 – 1 мкл конечного продукта ПЦР гена *stx2B* (желаемая длина ДНК – 210 п.н.).

Также для определения концентрации использовали инфракрасный спектрофотометр Direct Detect (Millipore, США). Систему заранее откалибровали с использованием раствора BCA в HEPES.

Чистоту полученных рекомбинантных белков проверяли электрофоретически в 12%-м и 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс.

Масс-спектрометрический анализ белков. Разделение пептидов проводили на нанопотоковом хроматографе Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром высокого разрешения Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific, Германия). Параметры хроматографии: колонка, набитая в лабораторных условиях (диаметр 75 мкм, длина 150 мм), заполнена фазой Aeris 3,6 мкм WIDEPORЕ XB-C18 (Phenomenex, США). Буферы для градиента А: вода mQ, 0,1% муравьиной кислоты. Фаза В: 80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты. Разделение проводили в профиле элюции с 5% В до 60% В в течение 120 мин. Скорость потока элюента 250 нл/мин. Панорамный масс-спектр записывали с разрешением 60 000 на 400 m/z, спектры фрагментации с разрешением 15 000 на 400 m/z. Фрагментацию ионов проводили в автоматическом режиме с использованием метода HCD (фрагментация, активированная соударениями в высокоэнергетической ячейке). Все измерения проводили при следующих условиях: напряжение на входном капилляре – 1,8 кВ, температура входного капилляра – 200°C, нормализованная энергия активации для HCD – 28,0, ширина изоляции целевого иона – 2 m/z. Анализ масс-спектрометрических данных проводили с помощью коммерческой программы PeaksStudio 7.5.

Результаты и обсуждение

Для продукции шига-токсинов использовали прокариотическую систему экспрессии *E. coli*. С использованием праймеров получили четыре фрагмента ДНК, содержащие последовательности генов с молекулярными массами около 900 п.н. (*stx1A*, *stx2A*) и 200 п.н. (*stx1B*, *stx2B*) (рис. 1).

Продукты ПЦР клонировали по технологии ТА-клонирования в вектор экспрессии pETSUMO. Рекомбинантные плазмиды, содержащие встроенные последовательности генов *stx1A*, *stx1B*, *stx2A* и *stx2B*, трансформировали в клетки *E. coli* OneShot Mach1-T1R. Данный штамм характеризуется ускоренным ростом, минимальной неспецифической рекомбинацией генов целевых белков и обеспечивает чистые препараты ДНК при выделении. Наличие в трансформантах плазмид, несущих гены субъединиц Stx-белков в правильной ориентации, определяли путем посева трансформантных клеток *E. coli* на среду с антибиотиком. Отобранные клоны использовали для выделения экспрессионных белковых конструкторов с целью дальнейшей верификации (рис. 2).

Количество нуклеотидных пар оснований соответствовало ожидаемым значениям для *stx1A* и *stx2A* (около 1100) и для *stx1B* и *stx2B* (около 400). Плазмиды секвенировали по Сэнгеру с праймеров SUMO Forward (5' AGATTCTTGTACGAC

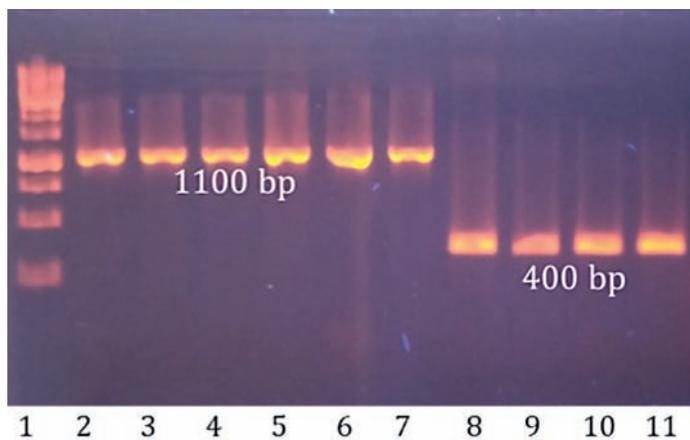


Рис. 2. ПЦР-анализ ДНК колоний трансформантов, несущих плазмиды с генами субъединиц шига-токсинов *E. coli*: дорожка 1 – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), дорожки 2–4 представляют собой продукты ПЦР гена субъединицы stx1A в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 1028 п.н.), дорожки 5–7 – продукты ПЦР гена субъединицы stx2A в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 1040 п.н.), дорожки 8, 9 – продукты ПЦР гена субъединицы stx1B в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 356 п.н.), дорожки 10, 11 – продукты ПЦР гена субъединицы stx2B в плазмиде рETSUMO (желаемая длина ДНК – 359 п.н.).

GGTATTAG 3') и T7 Reverse, проверили рамки считывания, а соответствие последовательностей референсным значениям подтвердили с использованием программы BLAST.

Выделение и очистку белков проводили при низких температурах, так как это позволяет сократить денатурирующие воздействия, возникающие из-за конформационной лабильности белков. Бактериальные осадки ресуспендировали и лизировали клетки, дополнительно подвергая ультразвуковой обработке для более полного разрушения клеточных стенок и максимального выхода белка.

Очистку лизата, осветленного центрифугированием, проводили на колонке с Ni-сефарозой, удерживающей белки, имеющие полигистидиновую метку. Преимущества данного сорбента заключаются в высокой емкости и дешевизне. Добавлением в систему элюирующего буфера отслеживали снятие белка с колонки по хроматограмме. Полученный раствор белка дополнительно очищали методом гель-фильтрации, обеспечивающей удаление низкомолекулярных веществ, в том числе имидазола (рис. 3).

По результатам электрофоретического разделения установили, что полученные His-SUMO-rStx1A, His-SUMO-rStx1B, His-SUMO-rStx2A и His-SUMO-rStx2B соответствуют своим молекулярным массам. После инкубирования с протеазой происходило отщепление полигистидиновой метки и полипептида SUMO. Повторная хроматография на никелевой колонке позволила получить высокоочищенные от посторонних примесей рекомбинантные белки rStx1A, rStx1B, rStx2A, rStx2B, полностью соответствующие своим молекулярным массам (рис. 4).

Конечный выход очищенных рекомбинантных белков из каждого литра культуры в среде ZYM-5052 составил: 1,7 мг для rStx1A; 1,9 мг для rStx2A; 2,5 мг для rStx1B и 2,7 мг для rStx2B.

Идентификация субъединиц шига-токсинов методом хромато-масс-спектрометрии на приборе Orbitrap Elite

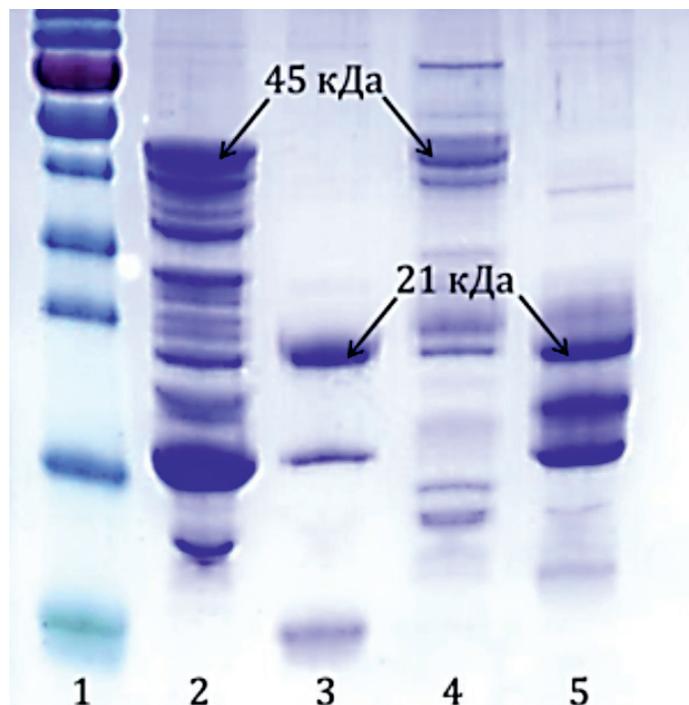


Рис. 3. Анализ рекомбинантных субъединиц Stx-белков, очищенных на колонке с сорбентом cOmpete His-Tag, с помощью SDS-PAGE в 12%-м ПААГ: дорожка 1 – маркер молекулярной массы белка PageRuler Prestained Protein Ladder; дорожка 2 – пик элюирования His-SUMO-rStx1A; дорожка 3 – пик элюирования His-SUMO-rStx1B; дорожка 4 – пик элюирования His-SUMO-rStx2A; дорожка 5 – пик элюирования His-SUMO-rStx2B.

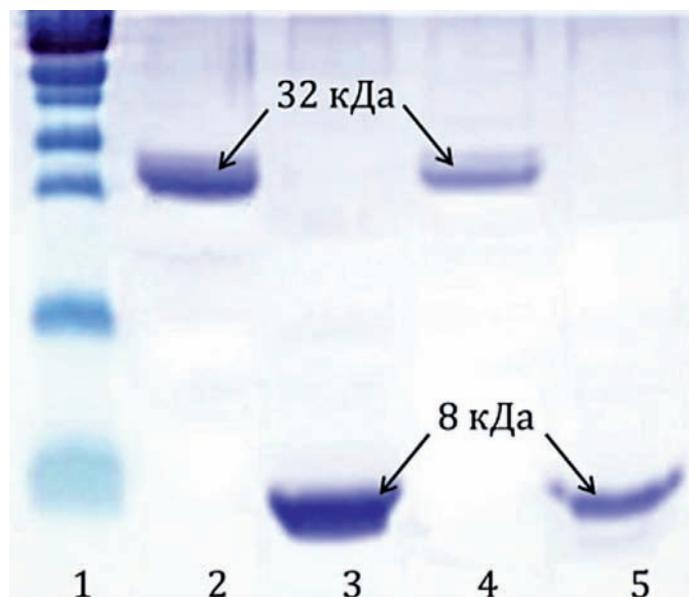


Рис. 4. Анализ рекомбинантных субъединиц Stx-белков с помощью SDS-PAGE в 15%-м ПААГ после расщепления SUMO-протеазой: дорожка 1 – маркер молекулярной массы белка PageRuler Prestained Protein Ladder; дорожка 2 – пик «проскока» белка rStx1A; дорожка 3 – пик «проскока» белка rStx1B; дорожка 4 – пик «проскока» белка rStx2A; дорожка 5 – пик «проскока» белка rStx2B.

(Thermo Scientific, Германия) определила 67 пептидов белка rStx1A с суммарным покрытием последовательности белка 56% (рис. 5).

Из этих идентифицированных пептидов 57 являются уникальными (табл. 2), т.е. последовательности этих пептидов

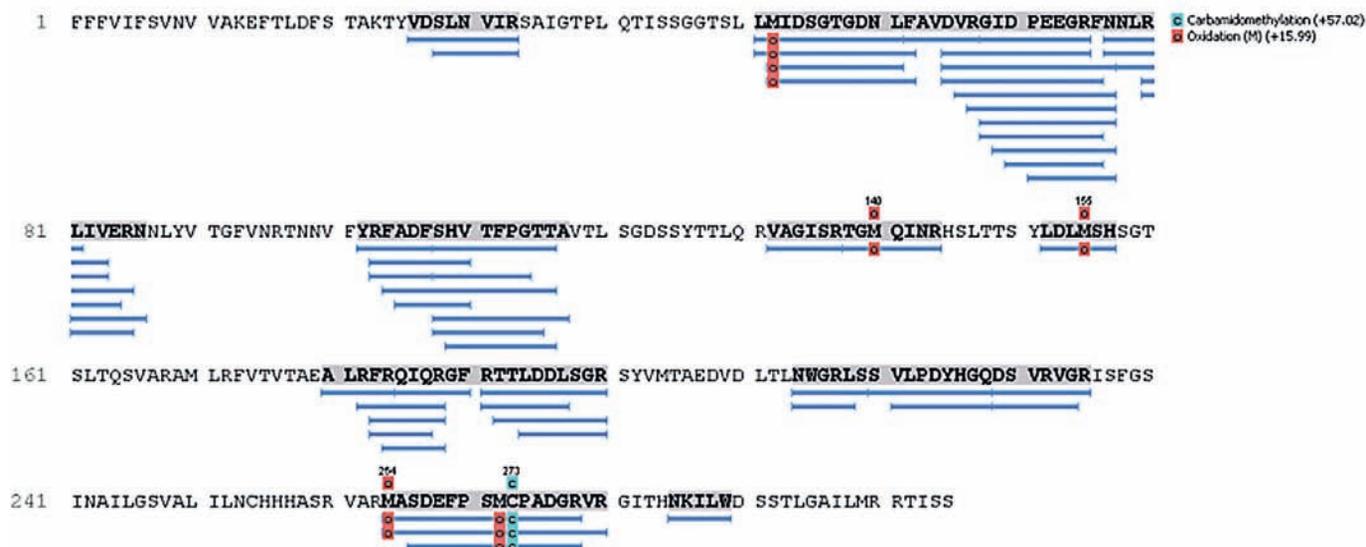


Рис. 5. Графическое изображение результатов идентификации белка rStx1A методом тандемной масс-спектрометрии. Отрезками под текстом последовательности белка представлены пептиды, идентифицированные при масс-спектрометрическом анализе. Буквами на отрезках указаны модификации ряда аминокислот – окисление метионина и модифицированный йодацетамидом цистеин.



Рис. 6. Графическое изображение результатов идентификации белка rStx2A методом тандемной масс-спектрометрии. Отрезками под текстом последовательностями белков представлены пептиды, идентифицированные при масс-спектрометрическом анализе. Буквами на отрезках указаны модификации ряда аминокислот – окисление метионина и модифицированный йодацетамидом цистеин.

не встречаются ни в каких других белках, экспрессируемых в бактериях.

Для белка rStx2A определили 95 пептидов, из них 82 уникальных (табл. 3). При этом суммарное покрытие последовательности белка составило 54% (рис. 6).

Для получения функционально активных рекомбинантных белков на основании анализа генетических особенностей шига-токсинов, синтезируемых разными штаммами *E. coli*, выбрали потенциально эффективный в качестве продуцента штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Выбор был обоснован наличием в целевых генетических последовательностях большого количества кодонов, синтез которых затруднен в обычной прокариотической системе экспрессии. *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS характеризуется наличием тРНК для кодонов AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, которые редко используются в *E. coli* дикого типа, что обеспечивает усиление экспрессии гетерологичных белков. Кроме того, *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS содержит плазмиду pLysS, которая продуцирует лизоцим фага T7, дополнительно ингибирующий транскрипцию T7-управляемых гетерологичных генов, что задерживает синтез токсичных для клеток-продуцентов белков до начала индукции.

Для экспрессии rStx1A, rStx2A, rStx1B и rStx2B применяли среду ZYM-5052. Данная среда позволяет поддерживать pH благодаря содержанию в ней фосфатного буфера и не требует добавления индуктора изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозиды, т.к. является аутоиндукционной [8]. В результате полученные культуры клеток имели высокую плотность и высокий выход рекомбинантного белка, учитывая сложность получения Stx-белков. Для предотвращения агрегации продуцируемых клетками субъединиц шига-токсинов проводили снижение температуры при культивировании, что также обеспечивало уменьшение количества гидрофобных взаимодействий, активизацию шаперонов, способствующих конформационному сворачиванию экспрессируемых белков, а также способствовало индукции биосинтеза протеаз теплового шока, образующихся при сверх экспрессии белков интереса [9].

Выбранный плазмидный вектор pETSUMO характеризуется наличием сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T7, стабильностью продукции потенциально токсических белков за счет низкого уровня копийности плазмид, наличием последовательностей, кодирующих 6 гистидинов, обеспечивающих очистку белков, и полипептида SUMO, выступающим эффективным катализатором фолдинга белка. Полипептид SUMO позволяет выделять белок из цитоплазмы в растворимой форме, что ускоряет и облегчает процесс получения белков интереса. В последующем полипептид SUMO отщепляется протеазой, при этом сохраняется нативная первичная последовательность целевого рекомбинантного белка. В результате выбранной стратегии получили высокоочищенные рекомбинантные Stx-белки, что подтвердили методом электрофореза. Идентичность рекомбинантных белков Stx1A, Stx2A, Stx1B, Stx2B подтвердили методом масс-спектрометрии.

В процессе проведения масс-спектрометрического анализа выявили наиболее часто повторяющиеся последовательности протеинов rStx1A, rStx2A, которые могут быть использованы при разработке базы для экспресс-идентификации шига-токсинов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 1.1.14.

Financial support

The work was performed within the framework of the state assignment for R&D 1.1.14.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Terajima J, Izumiya H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Saf (Tokyo)*. 2017 Jun 3; 5(2):35-53. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016029
2. Keir LS. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Jun;29(3):525-39. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.01.007
3. Карцев НН, Светоч ЭА. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*. *Бактериология*. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12
4. Kavaliauskiene S, Dyve Lingelem AB, Skotland T, Sandvig K. Protection against Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2017 Feb 3;9(2):44. DOI: 10.3390/toxins9020044
5. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
6. Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MJ, O'Brien AD. Comparisons of native Shiga toxins (Stxs) type 1 and 2 with chimeric toxins indicate that the source of the binding subunit dictates degree of toxicity. *PLoS One*. 2014 Mar 26;9(3):e93463. DOI: 10.1371/journal.pone.0093463
7. Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. *Protein Expr Purif*. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
8. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41(1):207-34. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016
9. Хайруллин РФ, Киямова РГ, Ризванов АА. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*. Казань: Изд-во Казан. ун-та; 2018, 142 с.

References

1. Terajima J, Izumiya H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Saf (Tokyo)*. 2017 Jun 3; 5(2):35-53. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016029
2. Keir LS. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Jun;29(3):525-39. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.01.007
3. Kartsev NN, Svetoch EA. Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of *E. coli*-producing shiga-toxins. *Bacteriology*. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12 (In Russian).
4. Kavaliauskiene S, Dyve Lingelem AB, Skotland T, Sandvig K. Protection against Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2017 Feb 3;9(2):44. DOI: 10.3390/toxins9020044
5. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
6. Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MJ, O'Brien AD. Comparisons of native Shiga toxins (Stxs) type 1 and 2 with chimeric toxins indicate that the source of the

- binding subunit dictates degree of toxicity. PLoS One. 2014 Mar 26;9(3):e93463. DOI: 10.1371/journal.pone.0093463
7. Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. Protein Expr Purif. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
8. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005 May;41(1):207-34. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016
9. Khairullin RF, Kiyamova RG, Rizvanov AA. Expression of recombinant proteins in *E. coli*. Kazan: Kazan, 2018, 142 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии 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) 31-1915
E-mail: marin@obolensk.org

Рогозин Метхун Мадибронович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии 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) 31-1915
E-mail: rogozin666@yandex.ru

Сурина Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов 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) 36-0065
E-mail: alexey_surin@mail.ru

Колумбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью (ученый секретарь) 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) 36-0069
Email: kolombet@obolensk.org

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А»
Телефон: (4967) 31-1915
E-mail: firstova@obolensk.org

Information about authors:

Maxim A. Maryin, Researcher Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1915
E-mail: marin@obolensk.org

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1915
E-mail: rogozin666@yandex.ru

Alexey K. Surin, PhD (Physical and Mathematical Sciences), Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065
E-mail: alexey_surin@mail.ru

Lubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Science), Scientific Secretary, Head of Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0069
Email: kolombet@obolensk.org

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Science), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Professor of the Faculty of Biological Safety, Pushchino State Institute of Natural Science
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1915
E-mail: firstova@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

19,2 миллиона фунтов стерлингов выделено на проект межправительственного надзора в целях защиты здоровья населения

Межведомственная проектная группа, занимающаяся надзором за патогенами в сельском хозяйстве, продовольствии и окружающей среде (PATH-SAFE), крупной программой надзора за патогенами, получила государственное финансирование проекта в рамках второго раунда Фонда общих результатов Казначейства Ее Величества.

Финансирование будет направлено на поддержку трехлетнего проекта по развитию пилотной национальной сети эпиднадзора с использованием новейших технологий секвенирования ДНК и отбора проб окружающей среды для улучшения обнаружения и отслеживания патогенов пищевого происхождения и патогенов, устойчивых к противомикробным препаратам, во всей агропродовольственной системе – от фермы до вилки. Сердцем этой «виртуальной» сети станет новая база данных, которая позволит анализировать, хранить и обмениваться данными о последовательностях и источниках патогенов, собранными по всей Великобритании как правительством, так и общественными организациями.



£19.2 million for cross-government surveillance project to protect public health | Food Standards Agency [Электронный ресурс].
URL: https://www.food.gov.uk/news-alerts/news/ps192-million-for-cross-government-surveillance-project-to-protect-public-health?utm_campaign=674700_July%20Newsletter&utm_medium=email&utm_source=ClearCourse%20on%20Behalf%20of%20Microbiology%20Society&dm_t=0,0,0,0 (дата обращения: 08.12.2021).

Безопасность применения бруцеллезной иммунопотенцированной вакцины для выявления скрытых форм бруцеллеза у животных

Е.М.Тё, И.Х.Маматкулов

Ташкентский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан

Работа посвящена разработке и использованию в практических условиях ветеринарии инновационного направления для борьбы с бруцеллезом, а именно: профилактики, диагностики скрытых форм заболевания, нейтрализации природного резервуара возбудителя, а также оздоровления племенного скота, что способствует его сохранению, увеличению его продуктивности и размножению. При этом ликвидируется возможность передачи этого заболевания людям от животных. Новизна исследования заключается в том, что изучаются молекулярно-генетическая структура микроба и его защитные свойства, чтобы предотвращать активизацию скрытой формы заболевания. На основании этого исследования была разработана лечебно-профилактическая вакцина и проведено доклиническое испытание на лабораторных животных.

Ключевые слова: адъювант, нуклеотидный комплекс, липополисахариды, клеточная стенка

Для цитирования: Тё Е.М., Маматкулов И.Х. Безопасность применения бруцеллезной иммунопотенцированной вакцины для выявления скрытых форм бруцеллеза у животных. Бактериология. 2021; 6(4): 39–43. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-39-43

Safety of brucellosis immunopotentiated vaccine administration to detect latent forms of brucellosis in animals

Е.М.Тюо, I.Kh.Mamatkulov

Tashkent Research Institute of Vaccines and Sera, Tashkent, Republic of Uzbekistan

The research deals with development and use in practical veterinary conditions of an innovative trend related to fighting against this disease, namely: prevention, diagnosis of latent forms of the disease, neutralization of the natural reservoir of virus as well as health improvement of pedigree livestock, which contributes to its preservation, increasing its productivity and reproduction. At the same time, possibility of the disease spread from animals to humans has been eliminated. The novelty of this research lies in the fact that molecular genetic structure of the microbe and its protective properties have been studied, thus preventing from activation of the disease latent form. Based on this study, a therapeutic and prophylactic vaccine has been developed. A preclinical testing of this vaccine has also been conducted on laboratory animals.

Key words: adjuvant, nucleotide complex, lipopolysaccharides, cell wall

For citation: Тюо Е.М., Маматкулов I.Kh. Safety of brucellosis immunopotentiated vaccine administration to detect latent forms of brucellosis in animals. Bacteriology. 2021; 6(4): 39–43. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-39-43

Бруцеллез является актуальной инфекцией для Республики Узбекистан. Основными направлениями борьбы с этим заболеванием являются: профилактика, диагностика скрытых форм заболевания, нейтрализация природных резервуара возбудителя, и, наконец, оздоровление племенного скота, что способствует его сохранению, увеличению его продуктивности и размножению [1]. Эти меры

способствуют предотвращению возможности передачи этого заболевания людям от животных, а также решают крупные экономические проблемы в животноводстве [4–6].

Целью настоящего исследования явилось изучение бруцеллезной иммунопотенцированной вакцины (БИВ) [2] для выявления скрытых форм бруцеллеза, оценка переносимости высоких доз и выявление наиболее чувствительных к

Для корреспонденции:

Маматкулов Ибрагим Хамидович, доктор медицинских наук, профессор, академик Туронской академии наук, заместитель директора по научной работе Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

Адрес: 100084, Ташкент, Юнусабадский район, ул. Чингиза Айтматова, 37
Телефон: (+998) 71 234-7767
E-mail: bibinor@list.ru

Статья поступила 07.10.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Ibragim Kh. Mamatkulov, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of Turon Academy of Sciences, Research Deputy Director of the Tashkent Research Institute of Vaccines and Sera

Address: 37, Chingiz Aytmatov str., Yunusabad District, Tashkent, 100084, Republic of Uzbekistan
Telephone: (+998) 71 234-7767
E-mail: bibinor@list.ru

The article was received 07.10.2021, accepted for publication 27.12.2021

Таблица 1. Температура тела кроликов после введения препарата БИВ

NN кроликов	Доза	Исходная t, °C	t после введения препарата, °C			
			1 ч	2 ч	3 ч	24 ч
1	1 мл/кг	39,05	38,6	38,6	38,85	39,65
2	1 мл/кг	38,95	39,45	39,45	39,3	39,2
3	1 мл/кг	39,1	39,45	39,5	39,4	39,2

изучаемому препарату органов и систем организма, характера и степени патологических изменений в них, а также исследование обратимости вызываемых повреждений у лабораторных животных.

Материалы и методы

Испытания проводились в Институте иммунологии РФ, Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии. Работа по изучению пирогенности, острой и хронической токсичности и эмбриотоксичности препарата перепроверена в Ташкентском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток Агентства по развитию фармацевтической отрасли Министерства здравоохранения Республики Узбекистан [3]. Полученные результаты не отличались от результатов, полученных ранее, по степени достоверности.

Исследования выполнены на белых мышах, морских свинках, крысах популяции Вистар, кроликах породы шиншилла. Проводилось изучение не только общетоксического действия

препарата, но и исследование специфических видов токсичности, таких как мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, гонадотоксичность и иммунотоксичность.

В опыте использовали 100 белых беспородных мышей массой не менее 20–22 г, из которых сформировали 9 групп по 10 голов: 9 подопытных и 1 контрольная. 9 опытным группам препарат БИВ вводили через рот в желудок с помощью шприца с иглой, у которой конец оканчивается оливой, в дозах по лекарственной форме 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 мл на мышь. После введения препарата проводили наблюдения в течение 7 дней.

Острую токсичность изучали также при подкожном введении препарата БИВ мышам. В опыте использовали 80 белых беспородных мышей массой 20–22 г, из которых сформировали 8 групп по 10 голов: 7 подопытных и 1 контрольная. 7 группам препарат БИВ вводили подкожно, в дозах по лекарственной форме 0,10; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл на мышь. После этого в первом опыте на крысах сравнивали раздражающее действие при подкожном введении. Для более наглядного результата лекарственное средство вводили в дозе, превышающей расчетную терапевтическую в 5 раз.

После усыпления и убоя крыс их вскрывали через 1, 5, 10, 15 и 20 суток. В результате за весь период исследования ни у одной крысы не выявили изменений в органах, тканях, а также в точках введения препарата и в областях, прилегающих к ним, при подкожном введении. Гиперемия и отечность тканей во все дни исследования отсутствовали. Проводилось также изучение пирогенности препарата БИВ на 3 кроликах породы шиншилла массой 2,5 кг.

Таблица 2. Результаты изучения острой токсичности препарата БИВ при введении в желудок мышей (n = 10)

№	Доза по лекарственной форме		Количество мышей			Время гибели, мин	% гибели	Клиническая картина
	мг/кг	мг/мышь	всего	выжило	пало			
1	500	10	10	10	0	–	–	Отклонений от показателей физиологической нормы не отметили
2	750	15	10	9	1	60	10	У 9 мышей отклонений от показателей физиологической нормы не отмечали, одна мышь пала в течение 60 мин
3	1000	20	10	8	2	50–70	20	У всех мышей небольшая вялость, сонливость, у 2 мышей более сильное угнетение и падёж через 50–70 мин
4	1250	25	10	6	4	45	40	У всех мышей угнетение, влажность шерстного покрова через 30 мин. У 6 мышей восстановились активные движения, а 4 мыши пали
5	1500	30	10	5	5	40–60	50	У всех мышей угнетение, влажность шерстного покрова. У 4 мышей судороги, активная фаза у всех мышей, затем 5 мышей были вялыми, а 5 погибли через 40–60 мин. Через 6 ч оставшиеся мыши не имели отклонений от нормы
6	1750	35	10	3	7	30–40	70	Угнетение всех мышей, повышенная влажность шерстного покрова, учащенное дыхание, активность через 20 мин, судороги, угнетение и падёж, начиная с 30 мин
7	2000	40	10	2	8	10–20	80	Резкое подпрыгивание через 10 мин пяти мышей, через 5 минут опять резкое подпрыгивание, затем угнетение и падёж через 10 мин
8	2500	45	10	1	9	20	90	Учащенное дыхание, влажность шерстного покрова, через 5 мин активные движения, тусклые глаза, угнетение с последующей гибелью. 1 мышь выжила
9	3000	50	10	0	10	15	100	Учащенное дыхание, влажность шерстного покрова, через 5 мин активные движения, судороги, тусклые глаза, угнетение с последующей гибелью
10	Контроль		10	10	0	–	–	Отклонений от показателей физиологической нормы не отмечали

БИВ по степени воздействия на организм относится к умеренно опасным веществам (3-й класс опасности по ГОСТ 12.1.00776).

Таблица 3. Результаты изучения острой токсичности препарата БИВ при введении в желудок крыс (n = 10)

№	Доза по лекарственной форме		Количество крыс			Время гибели, мин	% гибели	Клиническая картина
	мг/кг	мг/крысу	всего	выжило	пало			
1	500	10	10	10	0	0	0	Отклонений от показателей физиологической нормы не отметили
2	1000	20	10	9	1	70–90	10	1 крыса погибла через 70–90 мин. Через 6 ч оставшиеся крысы не имели отклонений от нормы
3	1500	30	10	7	3	60–90	30	У всех крыс угнетение, влажность шерстного покрова. У 3 крыс судороги, активная фаза у всех крыс, 3 погибли через 60–90 мин. Через 6 ч оставшиеся крысы не имели отклонений от нормы
4	2000	40	10	5	5	30–40	50	Резкое подпрыгивание через 15 мин пяти крыс, через 10 мин опять резкое подпрыгивание, затем угнетение и падёж через 10 мин
5	2500	45	10	2	8	15–20	80	Учащенное дыхание, влажность шерстного покрова, через 5–10 мин активные движения, судороги, тусклые глаза, угнетение с последующей гибелью 8 крыс
6	3000	50	10	0	10	15	100	Учащенное дыхание, влажность шерстного покрова, через 5 мин активные движения, судороги, тусклые глаза, угнетение с последующей гибелью
7	Контроль		10	10	0	–	–	Отклонений от показателей физиологической нормы не отметили

Таблица 4. Результаты изучения острой токсичности препарата БИВ при подкожном введении мышам (n = 10)

№	Доза по лекарственной форме		Количество мышей			Время гибели, мин	% гибели	Клиническая картина
	мг/кг	мг/мышь	всего	выжило	пало			
1	500	10	10	10	0	–	–	Отклонений от показателей физиологической нормы не отметили
2	750	15	10	9	1	90	10	У 9 мышей отклонений от показателей физиологической нормы не отмечали, одна мышь пала в течение 90 мин
3	1000	20	10	7	3	60–70	30	У всех мышей небольшая вялость, сонливость, у 3 мышей более сильное угнетение и падеж через 60–70 мин
4	1250	25	10	5	5	40–60	50	У всех мышей угнетение, влажность шерстного покрова через 30 мин. У 5 мышей восстановились активные движения, а 5 мышей пали
5	1500	30	10	3	7	30–60	70	У всех мышей угнетение, влажность шерстного покрова. У 3 мышей судороги, активная фаза у всех мышей, затем 3 мыши были вялыми, а 7 погибли через 30–60 мин. Через 6 ч оставшиеся мыши не имели отклонений от нормы
6	1750	35	10	1	9	20	90	Угнетение всех мышей, повышенная влажность шерстного покрова, учащенное дыхание, активность через 15 мин, судороги, угнетение и падёж, начиная с 20 мин
7	2000	40	10	10	10	5–10	100	Резкое подпрыгивание через 10 мин, учащенное дыхание, затем угнетение и падёж через 5–10 мин
10	Контроль		10	10	0	–	–	Отклонений от показателей физиологической нормы не отмечали

Результаты и обсуждение

Из приведенной табл. 1 видно, что препарат БИВ пирогенным эффектом не обладает.

Результаты изучения острой токсичности препарата БИВ на мышах и крысах при различных способах введения приведены ниже (табл. 2–4). Из представленных данных следует, что в зависимости от дозы препарата клиническая картина была разной. Общим является угнетение, вялость животных, у некоторых судороги, учащенное дыхание, тремор, возбуждение, сопровождающееся подпрыгиванием через 10–20 мин с последующим угнетением, тусклость глаз у погибающих особей.

Результаты, представленные в табл. 5, свидетельствуют о том, что после введения препарата в дозе 1/4 от ЛД₅₀ – 500 мг/кг – в

течение 3 дней гибель животных не наблюдали. При последующем введении препарата в дозе 1/3 от ЛД₅₀ – 666,7 мг/кг – в течение 6 дней пало 4 крысы. Оставшимся 16 крысам вводили препарат в течение 7 дней в дозе 1/2 от ЛД₅₀ – 1000 мг/кг, после чего пало еще 6 голов. Суммарная доза препарата, вызвавшая гибель 50% крыс, составила 12500,2 мг/кг. Коэффициент кумуляции определяли по формуле:

$$K_{\text{кум}} = \text{ЛД}_{50} \text{ хроническая} / \text{ЛД}_{50} \text{ острая} = 12500,2 / 2000 = 6,25,$$

где $K_{\text{кум}}$ – коэффициент кумуляции;

ЛД₅₀ хроническая – ЛД₅₀ для хронической формы;

ЛД₅₀ острая – ЛД₅₀ для острой формы.

Следовательно, коэффициент кумуляции составил 6,25, т.е. по общепринятой классификации по степени выраженности кумулятивных свойств препарат БИВ относится к 3-му классу малоопасных веществ.

Таблица 5. Результаты изучения кумулятивных свойств препарата БИВ на беспородных белых крысах при введении в желудок

Кол-во животных	Доза от ЛД ₅₀ , мг/кг	Суммарная доза, мг/кг	Кол-во дней введения	Кол-во погибших животных	Масса животных, $M \pm m$
20	1/4 (500)	1500	3	0	191,3 ± 4,8
20	1/3 (666,7)	4000,2	6	4	186,5 ± 7,3
16	1/2 (1000)	7000	7	6	189,4 ± 9,5

Таблица 6. Влияние препарата БИВ при введении в желудок в течение 14 дней на прирост массы тела крыс ($n = 30$)

Группа животных	Масса тела, г			
	Контроль	1/10 от ЛД ₅₀	1/20 от ЛД ₅₀	1/40 от ЛД ₅₀
0-я неделя	216 ± 11,2	216 ± 12,2	215 ± 13,2	218 ± 13,4
1-я неделя	232 ± 14,2	237 ± 16,4	238 ± 15,4	230 ± 14,2
2-я неделя	250 ± 13,6	256 ± 13,2	250 ± 16,4	250 ± 17,4

Таблица 7. Влияние препарат БИВ при введении в желудок в течение 14 дней на гематологические показатели крыс

Группы животных	Число животных	Гемоглобин, ммоль/л	Эритроциты, $10^{12}/л$	Лейкоциты, $10^9/л$
Контроль	10	13,8 ± 0,9	6,8 ± 0,2	15,84 ± 0,8
1/10 от ЛД ₅₀	10	13,8 ± 0,9	6,8 ± 0,3	15,0 ± 1,2
1/20 от ЛД ₅₀	10	14,0 ± 0,3	6,7 ± 0,2	15,8 ± 0,7
1/40 от ЛД ₅₀	10	13,4 ± 1,2	6,6 ± 0,3	15,8 ± 0,6

Гематологические показатели периферической крови крыс, получавших препарат БИВ в течение 14 дней, не отличались от таковых у контрольной группы животных (табл. 7).

На основании проведенных исследований можно сделать нижеследующие выводы:

1) БИВ по степени воздействия на организм относится к 3-му классу малоопасных веществ: ЛД₅₀ при введении в желудок белым мышам составляет 1500 мг/кг массы животного, белым крысам – 2000 мг/кг, при однократном подкожном введении БИВ мышам ЛД₅₀ составила 1250 мг/кг;

2) БИВ не вызывает раздражающего действия на ткани в точке введения и прилегающих к ней областях при однократном внутримышечном и подкожном введении крысам в дозе, превышающей терапевтическую в 25 раз;

3) при ежедневном пероральном введении БИВ крысам в течение месяца установлено, что доза 1/20 от ЛД₅₀ (100 мг/кг) является пороговой, а доза 1/100 от ЛД₅₀ (20 мг/кг) – недействующей, не вызывающей токсического эффекта;

4) БИВ в дозах 0,2 мг/кг по абамектину и 10 мг/кг по рафоксаниду при подкожном введении крысам в течение 10 дней не вызывает признаков токсикоза, гибели животных, изменения в органах, тканях, точке введения и прилегающих к ней областях;

5) по степени выраженности кумулятивных свойств БИВ относится к классу веществ со слабо выраженной кумуляцией. Коэффициент кумуляции равен 6,25;

6) результаты субхронического воздействия БИВ при пероральном ежедневном введении крысам в течение 14 дней

в дозах 0,4 мг/50 кг/день и 2 мг/кг/день показывают безвредность препарата и возможность его безопасного использования в ветеринарной практике для лечения сельскохозяйственных животных;

7) в хронических опытах (в течение 2 мес.) БИВ в дозе 0,01 и 0,001 от ЛД₅₀ не вызывает признаков токсикоза и гибели у крыс, не оказывает отрицательного влияния на прирост массы тела, гематологические, биохимические и урологические показатели животных. В дозе 0,01 от ЛД₅₀ БИВ в хроническом опыте у крыс вызывает незначительные изменения в гепатоцитах печени. В тканях других органов изменений не установлено. В дозе 0,001 от ЛД₅₀ изменений в органах не находили;

8) БИВ в терапевтической дозе не обладает алергизирующими, сенсибилизирующими, эмбриотоксическими, тератогенными и цитогенетическими свойствами.

Таким образом, изучение динамики и характера влияния БИВ на иммунологическую реактивность экспериментальных животных, проведенное на уровне оценки интегральных показателей гуморального и клеточного иммунитета, а также на уровне исследований функций иммунокомпетентных клеток, не выявило существенных сдвигов в функционировании иммунной системы. Отмеченные изменения носят транзиторный характер и являются, по-видимому, отражением течения вакцинального процесса.

Информация о финансировании

Бюджетное финансирование.

Financial support

Budget financing.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Рабочая программа по плану мероприятий по бруцеллезу на 2018–2020 гг. Тема: «Разработка и внедрение новых инновационных способов борьбы с бруцеллезом сельскохозяйственных животных в Узбекистане». Утверждена Джаббаровым ША, первым заместителем Государственного комитета ветеринарии Республики Узбекистан. 20 апреля 2018 г.
2. Тс 17249755-09:2018. Стандарт организации. Вакцина лечебно-профилактическая бруцеллезная молекулярная адьювантная. Технические условия. ООО «Bibinor», город Ташкент.
3. Отчет о результатах фармакологических и токсикологических исследований антигена БИВ (бруцеллезной иммунопотенцированной вакцины) для выявления скрытых форм бруцеллеза. Утвержден Маматкуловым АИ, директором СП ООО «Bibinor», 19 декабря 2019 г. и Ашуровым АА, директором ТашНИИВС.
4. Игнатов ПЕ. Диалоги о коварном бруцеллезе. М.: ВИЭВ; 2010, 103 с.
5. Игнатов ПЕ. Иммуитет и инфекция. Возможности управления. М.: Время; 2002, 352 с.
6. Animal Brucellosis. 1990; Ed.: Nielsen KH, Duncan JR; Boca Raton; CRC Press, 463 p.

References

1. Work Program for the Action Plan regarding Brucellosis for 2018–2020. Topic: “Development and Implementation of New Innovative Technology to Fight against Farm Animals Brucellosis in Uzbekistan”. Approved by Jabbarov ShA, First Deputy of the State Veterinary Committee of the Republic of Uzbekistan. April 20, 2018. (In Russian).
2. Ts 17249755-09: 2018. Corporate Standard. Therapeutic and Prophylactic Brucellosis Molecular Adjuvant Vaccine. Specification. LLC “Bibinor”, Tashkent. (In Russian).
3. Report on the Results of BIV Antigen Pharmacological and Toxicological Studies (Brucellosis Immunopotentiated Vaccine) to Detect Latent Forms of Brucellosis. Approved by Mamatkulov AI, Director of JV LLC “Bibinor”, on December 19, 2019; and Ashurov AA, Director of TashRIVS. (In Russian).

4. Ignatov PE. Dialogues about Insidious Brucellosis. Moscow, 2010. (In Russian).
5. Ignatov PE. Immunity and Infection. Management Capabilities. Moscow, 2002. (In Russian).
6. Animal Brucellosis. 1990; Ed.: Nielsen KH, Duncan JR; Boca Raton; CRC Press, 463 p.

Информация о авторе:

Тё Евгений Михайлович, старший научный сотрудник лаборатории BSL-3 Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток
Адрес: 100084, Ташкент, Юнусабадский район, ул. Чингиза Айтматова, 37
Телефон: (+998) 90 370-7675

Information about author:

Evgeniy M. Tyo, Senior Researcher of the BSL-3 Laboratory at the Tashkent Research Institute of Vaccines and Sera
Address: 37 Chingiz Aytmatov str., Yunusabad District, Tashkent, 100084, Republic of Uzbekistan
Phone: (+998) 90 370-7675

НОВОСТИ НАУКИ

Клеточный компонент, который превращает стафилококковые бактерии в смертельные

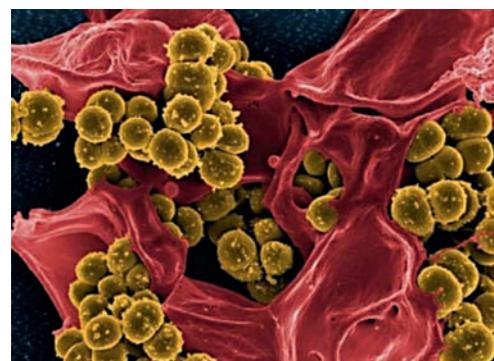
Бактерия *Staphylococcus epidermidis* – это обычно безвредный микроб, обнаруживаемый на коже и в носу людей. Тем не менее некоторые штаммы этого вида могут вызывать инфекции – в катетерах, искусственных суставах, сердечных клапанах и в кровотоке, – которые трудно лечить. Эти бактерии часто устойчивы к особенно эффективному антибиотику, метициллину, и относятся к числу микробов, которых больше всего боятся в больницах. Как эти обычно безобидные кожные микробы становятся смертельными патогенами, до сих пор неясно.

Ученые определили новый кластер генов, который позволяет более агрессивным бактериям создавать дополнительные структуры в своих клеточных стенках. Это морфологическое изменение позволяет стафилококкам легче прикрепляться к человеческим клеткам, образующим кровеносные сосуды, благодаря чему они могут сохраняться в кровотоке и становиться патогенами. Эти новые структуры клеточной стенки также могут способствовать распространению устойчивости к метициллину, передавая ее, например, от *S. epidermidis* к его более опасному родственнику *Staphylococcus aureus*.

Значительная часть клеточных стенок стафилококков, как и других грамположительных бактерий, состоит из тейхоевых кислот. Эти цепочечные полимеры покрывают поверхность бактерий. Их химическая структура различается в зависимости от вида. В ходе этого исследования определили, что многие патогенные штаммы *S. epidermidis* имеют дополнительный кластер генов, который содержит информацию для синтеза тейхоевых кислот стенки, которые на самом деле типичны для *S. aureus*.

Эксперименты показали, что бактерии *S. epidermidis*, содержащие только видоспецифические тейхоевые кислоты в стенках, не очень инвазивны, колонизируя поверхности кожи и слизистых оболочек. Если тейхоевые кислоты стенок для *S. aureus* также присутствуют, они не могут эффективно прикрепляться к этим поверхностям. Вместо этого они более успешно проникают в ткани своего человека-хозяина. В какой-то момент несколько клонов *S. epidermidis* унаследовали соответствующие гены от *S. aureus* и в результате стали угрожающими патогенами.

Разные структуры клеточной стенки обычно предотвращают перенос генов между *S. epidermidis* и *S. aureus*. Но в штаммах *S. epidermidis*, которые также могут продуцировать тейхоевые кислоты стенки *S. aureus*, этот тип переноса генов внешне становится возможным между разными видами. Это объясняет, как *S. epidermidis* может передавать устойчивость к метициллину еще более опасным – а затем и устойчивым к метициллину – *S. aureus*. Новые результаты являются важным шагом на пути к разработке более эффективных методов лечения или вакцинации против опасных патогенов, таких как *S. epidermidis* ST 23, который известен уже 15 лет и относится к группе HA-MRSE (метициллин-устойчивый *S. epidermidis*).



Du X, Larsen J, Li M, et al.

Staphylococcus epidermidis clones express *Staphylococcus aureus*-type wall teichoic acid to shift from a commensal to pathogen lifestyle.

Nat Microbiol. 2021;6:757-768. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00913-z>

Распространенность гименолепидоза в разрезе районов Самаркандской области

Л.Б.Махмудова

Филиал Республиканского специализированного научно-практического центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных болезней им. Л.М.Исаева, Самарканд, Республика Узбекистан

Целью исследования являлся анализ клинико-эпидемиологических особенностей гименолепидоза в Самаркандской области. Было установлено число случаев заболевания по районам Самаркандской области. Выявлена тенденция к снижению заболевания. Даны рекомендации по проведению эффективной профилактики гименолепидоза с учетом определения групп, наиболее опасных в эпидемиологическом отношении, критериев адекватной диагностики гименолепидоза с учетом особенностей в развитии гельминта.

Ключевые слова: гименолепидоз, диагностика, Самаркандская область, эпидемиология

Для цитирования: Махмудова Л.Б. Распространенность гименолепидоза в разрезе районов Самаркандской области. Бактериология. 2021; 6(4): 44–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-44-47

The prevalence of hymenolepidosis in the areas of the Samarkand region

L.B.Makhmudova

The Branch of the L.M.Isaev Republican Specialized Scientific and Practical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Samarkand, Republic of Uzbekistan

The aim of the study – analyze of the clinical and epidemiological features of hymenolepidosis in the Samarkand region. The number of cases of the disease was established in the districts of the Samarkand region. A tendency towards a decrease in the disease was revealed. There are given recommendations for the effective prevention of hymenolepidosis, taking into account the definition of the most dangerous epidemiologically dangerous groups, criteria for adequate diagnosis of hymenolepidosis, taking into account the peculiarities in the development of helminths.

Key words: hymenolepidosis, diagnostics, Samarkand region, epidemiology

For citation: Makhmudova L.B. The prevalence of hymenolepidosis in the areas of the Samarkand region. Bacteriology. 2021; 6(4): 44–47. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-44-47

Гименолепидоз – заболевание, проявляющееся общетоксическими, аллергическими реакциями и явлениями авитаминоза, преимущественно протекает с расстройствами желудочно-кишечного тракта. Гименолепидоз является одним из наиболее широко распространенных в мире гельминтозов человека [1].

Источником заражения гименолепидозом является человек. Механизм передачи гельминтоза – фекально-оральный, пути передачи – контактно-бытовой и пищевой. Факторами передачи карликового цепня являются загрязненные яйцами гельминта руки, предметы личной гигиены, дверные ручки, пищевые продукты, а также мухи, тараканы, на которых яйца гельминта *Hymenolepis nana* сохраняют свою жизне-

способность в течение суток. Яйца паразита относительно нестойки к воздействию факторов окружающей среды. Особенно чувствительны они к высушиванию и действию высоких температур. При высушивании на предметных стеклах при комнатной температуре все яйца погибают в течение 60–70 ч. В речной воде при температуре 18–20°C яйца выживают около месяца. Яйца карликового цепня сохраняют жизнеспособность на руках человека до 2 ч [2].

В кишечнике человека могут паразитировать одновременно тысячи особей гельминтов. Внедряясь в организм хозяина на стадии личинки, паразиты могут мигрировать по организму, пока не превратятся во взрослую особь в кишечнике. Симптомами болезни являются проявляющиеся в

Для корреспонденции:

Махмудова Лола Бахроновна, исполняющая обязанности директора филиала Республиканского специализированного научно-практического центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных болезней им. Л.М.Исаева

Адрес: 140100, Республика Узбекистан, Самарканд, ул. Ходжи Ахрор Вали, 25
Телефон: 998 (71) 239-4795
E-mail: bibinor@list.ru

Статья поступила 14.10.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Lola B. Makhmudova, Acting Director of the Branch of the L.M.Isaev Republican Specialized Scientific and Practical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases

Address: 25 Khodja Ahror Vali str., Samarkand, 140100, Republic of Uzbekistan
Telephone: 998 (71) 239-4795
E-mail: bibinor@list.ru

The article was received 14.10.2021, accepted for publication 27.12.2021

виде приступов боли в области живота, изжога, тошнота, диарея, дисбактериоз, головная боль, головокружения, высыпания на коже, потеря аппетита и резкое снижение массы тела [2, 3].

Инвазия сопровождается нарушением функций всех систем органов человека, нарушением иммунитета и в большинстве случаев является хроническим заболеванием [4].

Наличие паразитарного заболевания у ребенка приводит к угнетению неспецифической резистентности организма, что ведет к увеличению частоты острых респираторных и инфекционных заболеваний. Достоверно доказано снижение выработки защитных антител при вакцинации дифтерии у инвазированных. Ухудшается формирование иммунитета при ревакцинации кори и столбняка у больных с паразитарным заболеванием. Также у детей с гельминтозом чаще регистрируется ложный вираж туберкулиновых проб. Иммунная система всегда реагирует на действие паразитарного антигена, и длительное хроническое течение инвазии вызывает ее истощение. Снижение Т-лимфоцитов у больного приводит к развитию бактериально-вирусных и аллергических осложнений [5, 6].

По Б.А.Астафьеву, инвазированные карликовым цепнем могут быть поделены на 3 группы – инвазированные, у которых 1) наступает спонтанное самоизлечение и вырабатывается прочный иммунитет к повторному экзогенному и внутрикишечному заражению, 2) создается относительный иммунитет, препятствующий только внутрикишечному заражению, 3) иммунитет совсем или почти совсем не создается к обоим видам заражения.

В эпидемиологическом отношении 3-я группа самая опасная как длительный и постоянный источник рассеивания яиц карликового цепня. Дети в возрасте 10–14 лет в большинстве случаев избавляются от гименолепидоза без лечения,

что связывают с формированием зрелого возрастного иммунитета, а также с приобретением и закреплением гигиенических навыков [2].

Гименолепидоз распространен практически повсеместно, но наиболее обширно – среди населения южных климатических зон, в частности в странах Латинской Америки, Северной Африки, Италии, Иране, Пакистане, Афганистане, Центральной Азии, Казахстане, Молдове, Азербайджане, Грузии, Армении, Украине, на Северном Кавказе, в Томской, Амурской и других областях Российской Федерации [1, 7, 8].

Цель исследования: изучить распространенность гименолепидоза в разрезе районов Самаркандской области на современном этапе.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ заболеваемости по отчетам Самаркандского Центра государственного-санитарно-эпидемиологического надзора (ЦГСН) за период 2015–2020 гг.

Результаты и обсуждение

В Самаркандской области, по данным ЦГСН, частота заболевания гименолепидозом за период с 2015 по 2020 г. составила соответственно 2557, 2427, 1725, 1772 и 1386 случаев (табл. 1, 2).

Из табл. 1 следует, что инвазированность гименолепидоза в Самаркандской области по районам в 2015 г. составила от 1,3 до 27,8% случаев в общей структуре заболеваемости. Наименьшее число случаев – 1,3% – наблюдалось в Пастдаргомском районе, наибольшее – в Нурабадском районе (27,8%). В 2020 г. инвазированность гименолепидозом

Таблица 1. Общее число выявленных случаев заболевания гименолепидозом по Самаркандской области

№	Города и поселки	Число случаев											
		2015		2016		2017		2018		2019		2020	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	Самарканд	200	7,8	102	4,2	125	7,2	111	6,3	131	7,6	59	4,3
2	Каттакурган	40	1,6	61	2,5	41	2,4	30	1,7	36	2,1	18	1,3
3	Ақдарынський р-н	164	6,4	133	5,5	151	8,	144	8,1	124	7,2	36	2,6
4	Булунгурский р-н	154	6,0	35	1,4	30	1,7	17	1,0	24	1,4	19	1,4
5	Джамбай р-н	104	4,0	193	8,0	67	3,9	44	2,5	127	7,4	170	12,3
6	Иштиханский р-н	107	4,2	173	7,1	122	7,1	138	7,8	69	4	37	2,7
7	Катта-Курганский р-н	177	7,0	111	4,6	55	3,2	41	2,3	42	2,4	25	1,8
8	Кушрабатский р-н	53	2,1	6	0,2	7	0,4	7	0,4	5	0,3	2	0,1
9	Нарпайский т.	286	11,2	173	7,1	99	5,7	18	1,0	6	0,3	5	0,4
10	Нуробад р-н	711	27,8	603	24,8	406	23,5	628	35,4	558	32,3	671	28,4
11	Пайарыкский р-н	66	2,6	416	17,1	294	17,0	224	12,7	249	14,4	105	7,6
12	Пастдаргомский р-н	34	1,3	54	2,2	57	3,3	37	2,1	44	2,6	28	2,0
13	Пахтачийский р-н	309	12,1	295	12,2	212	12,3	175	9,9	167	9,7	124	8,9
14	Самаркандский р-н	52	2,0	2	0,1	3	0,2	-	-	-	-	-	-
15	Тайлякский р-н	25	1,0	26	1,1	23	1,3	9	0,5%	21	1,2	5	0,34
16	Ургутский р-н	75	2,9	42	1,7	32	1,9	149	8,4%	255	14,8	82	5,9
По области		2557		2427		1725		1772				1386	

Таблица 2. Число выявленных случаев заболевания гименолепидозом среди детей по Самаркандской области

№	Города и поселки	Число случаев											
		2015		2016		2017		2018		2019		2020	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	Самарканд	188	7,8	91	4,0	118	7,5	99	6,1	127	7,3	159	7,0
2	Каттакурган	36	1,5	50	2,2	34	2,2	24	1,5	28	1,6	34	1,50
3	Ақдарьинский р-н	162	6,7	133	5,8	149	9,5	144	8,8	124	7,1	136	5,98
4	Булунгурский р-н	144	6,0	311	13,6	28	1,8	15	0,9	23	1,3	119	5,24
5	Джамбайский р-н	86	3,6	177	7,7	55	3,5	32	2,0	103	5,9	149	6,56
6	Иштиханский р-н	107	4,4	193	8,4	119	7,6	138	8,5	69	3,9	137	6,03
7	Каттакурганский р-н	177	7,3	111	4,8	53	3,4	40	2,4	42	2,4	125	5,50
8	Кушрабадский р-н	42	1,7	6	0,3	7	0,4	7	0,4	5	0,3	52	2,29
9	Нарпайский р-н	257	10,7	170	7,4	47	3,0	9	0,6	21	1,2	202	8,89
10	Нурабадский р-н	682	28,3	694	30,3	361	23,0	537	32,9	501	28,6	561	24,68
11	Пайарькский р-н	63	2,6	64	2,8	289	18,4	222	13,6	246	14,1	250	10,0
12	Пастдаргомский р-н	40	1,7	34	1,5	57	3,6	37	2,3	32	1,8	38	1,68
13	Пахтачийский р-н	212	8,8	286	12,5	198	12,6	173	10,6	160	9,1	220	0,97
14	Самарканд тумани	42	1,7	2	0,1	3	0,2	–	–	–	–	–	–
15	Тайлякский р-н	19	0,8	26	1,1	21	1,3	9	0,6	15	0,9	7	0,31
16	Ургутский р-н	72	3,0	42	1,8	30	1,9	147	9,0	254	14,5	84	3,70
По области		2410		2289		1569		1633		1750		2273	

по районам составила от 0,1 до 28,8% случаев. Отмечалось наименьшее количество случаев в Кушрабатском районе и наибольшее – в Нурабадском районе. Увеличение инвазированных гименолепидозом в 2020 г. отмечается в Джамбайском районе – 4,0% в 2015 г. и 12,3% в 2020 г., в Нурабадском районе – 27,8% в 2015 г. и 28,4% в 2020 г. В остальных районах области отмечается снижение заболеваемости.

Таким образом, за период 2015–2020 гг. отмечается некоторое снижение заболеваемости гименолепидозом по районам области.

В основном страдают дети.

Из табл. 2 видно, что в 2015 г. инвазированные дети составили 80,0% случаев от общего числа больных гименолепидозом. В 2020 г. инвазированность детей достигла 94,3% случаев.

Высокую пораженность детей карликовым цепнем можно связать с несоблюдением детьми правил личной гигиены.

Различные показатели пораженности карликовым цепнем по районам зависят от условий быта, соблюдения санитарных норм и личной гигиены, а также от правильной лабораторной диагностики заболевания.

Однако необходимо отметить, что адекватная лабораторная диагностика гименолепидоза должна учитывать особенности в развитии гельминта. У больных вслед за периодом непрерывного выделения яиц отмечается пауза, которая сменяется новым периодом выделения. Длительность периодов выделения и пауз зависит от интенсивности инвазии. Уровень последней у больных не может быть постоянным, так как зависит от множества внешних и внутренних факторов. К этим факторам следует отнести: продолжительность жизни одного поколения карликовых цепней; особенности популяции возбудителя; на-

личие суперинвазий (экзогенных и внутрикишечных); резистентность организма, зависящую как от индивидуальных особенностей больного, так и от всевозможных факторов внешней среды (климат, питание, сопутствующие заболевания и др. [4].

В связи с периодичностью выделения яиц у инвазированных контактировавших с больным гименолепидозом следует обследовать трехкратно с интервалом в 15–20 дней.

Критерием диагностики является обязательное обнаружение в пробах фекалий яиц карликового цепня (копроовоскопическими методами с обогащением) или отдельных особей.

Несоблюдение правил диагностики может приводить к ложноотрицательным результатам [7, 9].

Заболеваемость можно снизить с помощью тщательной утилизации человеческих экскрементов, чтобы ограничить распространение паразитов в окружающей среде, проверки мяса и кулинарной обработки пищи, а также повышения уровня гигиены систем водоснабжения.

Выводы

Гименолепидоз остается одним из наиболее распространенных гельминтозов в Самаркандской области. В основном страдают дети – 94,3% случаев в общей структуре заболеваемости.

По районам наибольшее количество случаев отмечено в Нурабадском районе (27,8% в 2015 г. и 28,4% в 2020 г.), наименьшее – в г. Каттакургане (1,6% в 2015 г. и 0,34% в 2020 г. от общего числа инвазированных гименолепидозом).

За период с 2015 по 2020 г. число случаев заболевания гименолепидозом имеет некоторую тенденцию к снижению – с 2557 до 1386 человек.

Информация о финансировании

Бюджетное финансирование.

Financial support

Budget financing.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Авдюхина ТИ, Константинова ТН, Прокошева МН. Современный взгляд на проблему гельминтозов у детей и эффективные пути ее решения. *Лечащий врач.* 2004;1:34-37.
2. Крамарев СА. Гельминтозы у детей. *Здоровье ребенка.* 2006;2(2).
3. Сергиев ВП, Кузнецова КЮ. Современные проблемы в сфере паразитарных болезней и их терапии. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2014;1(6):12-16.
4. Crompton DW, Nesheim MC. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:35-59. DOI: 10.1146/annurev.nutr.22.120501.134539
5. Бодня ЕИ. Проблема профилактики паразитозов в современных условиях. *Новости медицины и фармации.* 2005;20-22:9.
6. Кочергина ЕА, Корюкина ИП, Зубов ЕВ. Особенности лечения паразитарных заболеваний. *РМЖ.* 2004;13:815.
7. Агафонова Е, Клыкова ТВ, Ефремова АИ, Долбин ДА. Современные подходы к оптимизации диагностики паразитарных инвазий у детей. *Материалы XVI Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии».* Москва, 24–27 февр. 2012 г. М., 2012, с. 5.
8. Albonico M, Allen H, Chitsulo L, Engels D, Gabrielli AF, Savioli L. Controlling soil-transmitted helminthiasis in pre-school-age children through preventive chemotherapy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Mar 26;2(3):e126. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000126

9. Никитин АФ, Жоголев ДТ, Захаркив ЮФ, Мокроусов ВН. Лабораторная диагностика паразитарных болезней. *Медицинские технологии.* Т. 1. М.: Интермедика; 1998, с. 327-88.

References

1. Avdyukhina TI, Konstantinova TN, Prokosheva MN. Sovremennyy vzglyad na problemu gel'mintozov u detei i effektivnyye puti ee resheniya. *Lechashchii vrach.* 2004;1:34-37. (In Russian).
2. Kramarev SA. Gel'mintozy u detei. *Child's health (Zdorov'e rebenka).* 2006;2(2). (In Russian).
3. Sergiyev VP, Kuznetsova KYu. Parasitic diseases: current therapeutic and other problems. *Infectious Diseases. News, Opinions, Training.* 2014;1(6):12-16. (In Russian).
4. Crompton DW, Nesheim MC. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:35-59. DOI: 10.1146/annurev.nutr.22.120501.134539
5. Bodnya EI. Problema profilaktiki parazitozov v sovremennykh usloviyakh. *Novosti meditsiny i farmatsii.* 2005;20-22:9. (In Russian).
6. Kochergina EA, Koryukina IP, Zubov EV. Osobennosti lecheniya parazitarnykh zabolevanii. *RMJ (Russian Medical Journal).* 2004;13:815. (In Russian).
7. Agafonova E, Klykova TV, Efremova AI, Dolbin DA. Modern approaches to optimizing the diagnosis of parasitic infestations in children. *Proceedings of the XVI Congress of Pediatricians of Russia with international participation "Actual problems of pediatrics".* Moscow, 24–27 Feb 2012 г. Moscow, 2012, p. 5. (In Russian).
8. Albonico M, Allen H, Chitsulo L, Engels D, Gabrielli AF, Savioli L. Controlling soil-transmitted helminthiasis in pre-school-age children through preventive chemotherapy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Mar 26;2(3):e126. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000126
9. Nikitin AF, Zhogolev DT, Zakharkiv YuF, Mokrousov VN. Laboratory diagnostics of parasitic diseases. *Medical technologies.* Vol. 1. Moscow: "Intermedika" Publ.; 1998, pp. 327-88. (In Russian).

Завершился 3-й Российский микробиологический конгресс

Конгресс проходил в Пскове с 26 сентября по 1 октября 2021 г. В его рамках было представлено 143 постерных доклада, а также проведен конкурс молодых ученых. Лучшие авторы получили более 20 грантов и денежных премий от Федерации европейских микробиологических обществ, Международного общества микробной экологии и Межрегионального микробиологического общества. Одновременно состоялся 6-й съезд Межрегионального микробиологического общества, прошли круглые столы по вопросам экологии и биотехнологии фототрофных микроорганизмов и проблеме правового регулирования в биотехнологии, а также встреча с редакцией журнала «Микробиология».

*Итоги работы Микробиологического Конгресса
МОО Микробиологическое общество [Электронный ресурс]. URL: <http://microbiosociety.ru/itogi-raboty-mikrobiologicheskogo-kongressa.html>
(дата обращения: 08.12.2021).*



Современное состояние разработки терапевтических препаратов для нейтрализации коронавируса SARS-CoV-2

В.В.Фирстова^{1,2}, Л.В.Коломбет¹, И.Г.Шемякин¹

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

²ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт», Пушкино, Московская область, Российская Федерация

Продолжающаяся глобальная пандемия коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID-19) требует срочной разработки эффективных и безопасных профилактических и терапевтических мер. Антивирусные пептиды являются перспективными потенциальными препаратами для лечения коронавирусной инфекции. Их идентификация и конструирование – одна из стратегий разработки терапевтических агентов против SARS-CoV-2. В статье представлен обзор разрабатываемых препаратов на основе белковых молекул, в том числе нейтрализующих антител.

Ключевые слова: COVID-19, гликопротеин S, антивирусные пептиды, нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела

Для цитирования: Фирстова В.В., Коломбет Л.В., Шемякин И.Г. Современное состояние разработки терапевтических препаратов для нейтрализации коронавируса SARS-CoV-2. Бактериология. 2021; 6(4): 48–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-48-55

Current state of development of therapeutic preparations for neutralizing the SARS-CoV-2 coronavirus

V.V.Firstova^{1,2}, L.V.Colombet¹, I.G.Shemyakin¹

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

²Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

The ongoing global coronavirus infection 2019 (COVID-19) pandemic requires the urgent development of effective and safe preventive and therapeutic measures. Antiviral peptides are promising potential drugs for the treatment of coronavirus infection. The identification and design of therapeutic peptides is one of the strategies for the development of therapeutic agents against SARS-CoV-2. An overview of the drugs under development based on protein molecules, including neutralizing antibodies, is presented in the article.

Key words: COVID-19, glycoprotein S, antiviral peptides, antibodies neutralizing SARS-CoV-2

For citation: Firstova V.V., Colombet L.V., Shemyakin I.G. Current state of development of therapeutic preparations for neutralizing the SARS-CoV-2 coronavirus. Bacteriology. 2021; 6(4): 48–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-48-55

С момента появления в декабре 2019 г. коронавирусного заболевания COVID-19 (COrona Virus Disease 2019) до сентября 2021 г. количество случаев заражения достигло 220 млн, из которых более 4 550 000 закончилось летальным исходом. Возбудителем COVID-19 является β-коронавирус (β-CoV), ныне известный как коронавирус-2 тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory

syndrome-related coronavirus 2/SARS-CoV-2). Предполагается, что подобно другим коронавирусам человека, таким как коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome/MERS-CoV) и SARS-CoV, SARS-CoV-2 имеет зоонозное происхождение. SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 могут вызывать серьезные симптомы и даже смерть с коэффициентами летальности 10, 37

Для корреспонденции:

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А»
Телефон: (4967) 31-1915
E-mail: firstova@obolensk.org

Статья поступила 02.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Science), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Professor of the Faculty of Biological Safety, Pushchino State Institute of Natural Science

Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1915
E-mail: firstova@obolensk.org

The article was received 02.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

и 5% соответственно. Из вышеперечисленных трех коронавирусов только SARS-CoV-2 вызвал глобальную пандемию, что связано с его высокой контагиозностью и возможностью легкой передачи от человека к человеку еще до появления выраженных симптомов заболевания. SARS-CoV-2 способен инфицировать людей разных возрастных групп и вызывать разнообразный спектр проявлений болезни. Большинство пациентов с COVID-19 либо бессимптомны, либо имеют легкие симптомы, включая лихорадку, миалгию и кашель. Однако некоторые пациенты могут страдать от умеренного до тяжелого, опасного для жизни острого респираторного дистресс-синдрома (acute respiratory distress syndrome/ARDS) с возможными летальными исходами, что свидетельствует о важности разработки вакцинных и терапевтических препаратов.

Коронавирус SARS-CoV-2 относится к оболочечным вирусам с положительно-смысловым одноцепочечным геномом РНК размером ~30 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов), который кодирует четыре структурных белка, включая поверхностный шиповидный гликопротеин (S – spike), мембранный (M – membrane), нуклеокапсид (N – nucleocapsid) и оболочечный (E – envelope). Геном РНК также кодирует 16 неструктурных белков (nsp1–16) и дополнительные белки, участвующие в вирусной репликации и патогенезе (рис. 1).

Поверхностный шиповидный гликопротеин S представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, который играет важную роль в инфицировании вирусом клетки-хозяина и является общим для всех коронавирусов. S-белки состоят из двух субъединиц – S1 и S2 (рис. 1b). Субъединица S1 связывается с рецептором клетки через свой рецептор-связывающий домен (RBD), после чего следуют конформационные изменения в субъединице S2, что позволяет слитому пептиду встраиваться в мембрану клетки-мишени. В составе субъединицы S2 имеются две области гептадного повтора (HR1 и HR2) (рис. 1c). HR1 изменяет форму таким образом, что обнажаются три высококонсервативных гидрофобных бороздки на поверхности, которые связывают геп-

тадный повтор 2 (HR2). Эта структура с ядра пучков из шести спиралей (6-НВ) формируется в процессе слияния и помогает сблизить вирусную и клеточную мембраны для проникновения вируса [3].

Традиционный механизм нейтрализации вирусов заключается в блокировании сайта связывания рецептора, расположенного между RBD и ACE2 (в случае рассматриваемых коронавирусов). Высокое сходство аминокислот в RBD коронавирусов позволяет предположить возможность использования ранее полученных нейтрализующих антител, нацеленных на RBD MERS-CoV или SARS-CoV, для ингибирования SARS-CoV-2.

Последовательность SARS-CoV-2 гомологична RBD SARS-CoV примерно на 73–76%. Сравнительный анализ рецептор-связывающих мотивов (receptor-binding motif/RBM) SARS-CoV и SARS-CoV-2, представляющих собой часть RBD, непосредственно контактирующую с ACE2, показал, что большинство аминокислот, необходимых для связывания ACE2, консервативны. Девять аминокислот ACE2, контактирующих с аминокислотами RBD коронавируса, полностью консервативны, а четыре – частично. Логично предположить, что препараты, направленные на ингибирование вирусов SARS-CoV, могут быть эффективными для терапии SARS-CoV-2.

На рис. 2 показано сравнение структуры генома и генетической изменчивости, наблюдаемой у вирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Область, отмеченная красным пунктирным кружком, показывает область генома, которая подвержена мутации, делеции и вставке, что делает возможным появление новых штаммов вирусов, в том числе с повышенной вирулентностью.

S-белок имеет молекулярную массу 180–200 кДа и характеризуется метастабильной конформацией. Однако при взаимодействии вируса с клеткой-хозяином запускается обширная структурная перестройка S-белка, благодаря которой становится возможным слияние вируса с мембраной клетки-хозяина. Благодаря тому, что S-белок покрыт моле-

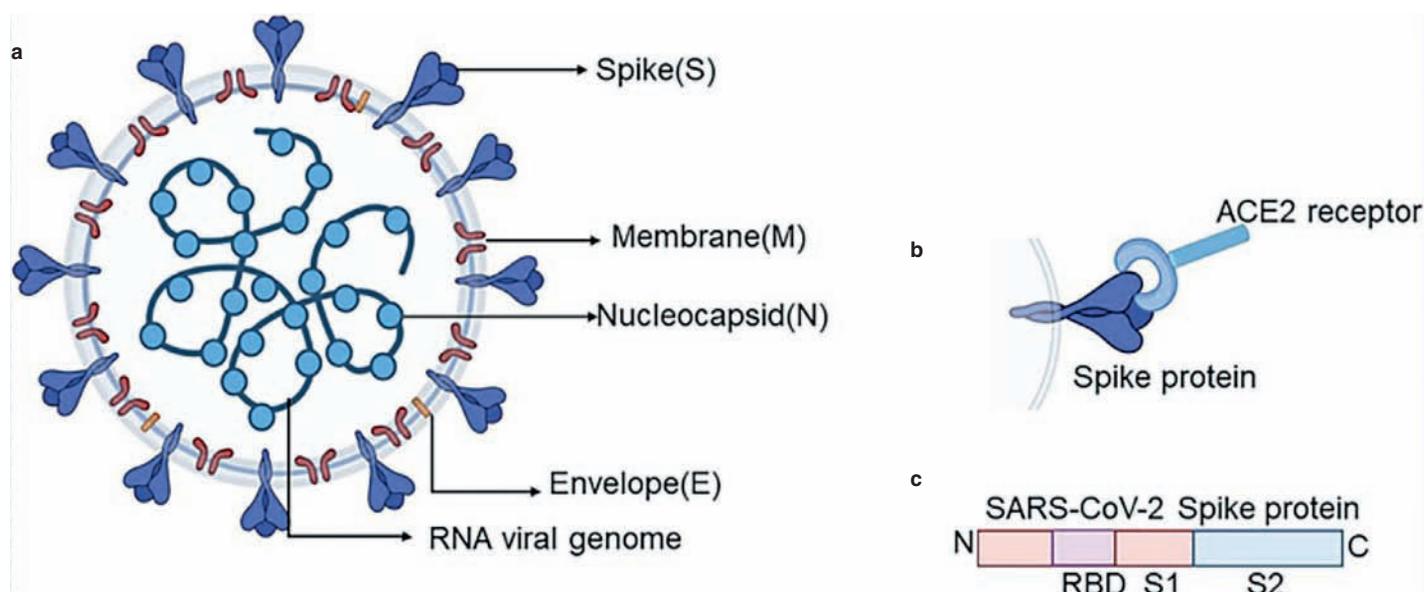


Рис. 1. Структурно-функциональная организация коронавируса SARS-CoV-2: а) схема строения коронавируса SARS-CoV-2; б) схематическое изображение контакта коронавируса SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим рецептором 2 (ACE2), находящимся на поверхности клетки-хозяина; в) структура S-белка, содержащая S1- и S2-домены (S1 содержит субъединицу RBD) [1, 2].

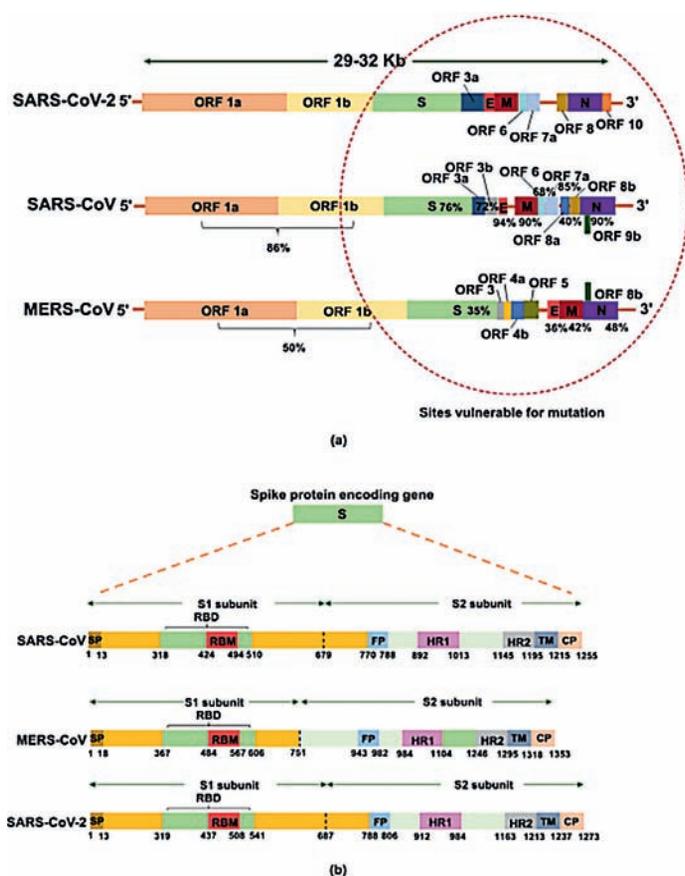


Рис. 2. Схематическое изображение геномов РНК коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 [4]: а) сравнение геномов РНК коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2; уровень гомологии последовательностей отражен в процентах; б) сравнение аминокислотных последовательностей S-белка вирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 (ORF – открытая рамка считывания, NTD – N-концевой домен, CTD – C-концевой домен, FP – пептид слияния, HR1–2 – гептадные повторы 1–2).

кулами полисахарида, обеспечивается его маскировка от системы иммунного ответа хозяина [5, 6].

Общая длина S-белка SARS-CoV-2 составляет 1273 аминокислотных остатка (а.о.). S-белок состоит из сигнального пептида (а.о. 1–13), расположенного на N-конце, субъединиц S1 (а.о. 14–685) и S2 (а.о. 686–1273). Субъединица S1 участвует в связывании с рецептором ACE2 на клетках-хозяевах. Субъединица S2 участвует в слиянии мембран вирус-хозяин [7]. В субъединице S1 выделяют N-концевой домен (14–305 а.о.) и RBD (319–541 а.о.). Субъединицу S2 составляют: пептид слияния (fusion peptide/FP, 788–806 а.о.), последовательность одного гептадного повтора (heptapeptide repeat sequence/HR1, 912–984 а.о.), последовательность второго гептадного повтора (HR2, 1163–1213 а.о.), трансмембранный домен (transmembrane domain/TM, 1213–1237 а.о.) и домен цитоплазмы (1237–1273 а.о.) (рис. 3а). Форма S-белка визуально представляет характерный луковичный венец, окружающий вирусную частицу (рис. 1а, 3б). Мономеры субъединицы S1 и S2 образуют луковичную головку и область стебля. Структура S-белка SARS-CoV-2 была определена с помощью криоэлектронной микроскопии на атомном уровне, выявив различные конформации RBD S-белка в открытом и закрытом состояниях и его соответствующие функции (рис. 3б, 3с) [8].

В нативном состоянии S-белок существует как неактивный предшественник. Во время вирусной инфекции протеазы клеток-мишеней активируют S-белок, расщепляя его на субъединицы S1 и S2, что необходимо для активации домена слияния мембран и проникновения вируса в клетки-мишени [9].

Субъединица S2 отвечает за слияние и проникновение вируса. FP (протеин слияния) состоит в основном из гидрофобных остатков, таких как глицин (G) или аланин (A), которые прикрепляются к мембране-мишени, когда S-белок принимает форму прешпильки. Оказалось, что FP играет важную роль в обеспечении слияния мембран, разрушая и соединяя липидные бислои мембраны клетки-хозяина [10]. HR1 и HR2 образуют шестиспиральный пучок (6-HB) (рис. 3е), который важен для вирусного слияния и внедрения субъединицы S2 в клетку хозяина. При связывании RBD с ACE2 происходит изменение конформации S2: FP встраивается в клеточную мембрану-мишень, обнажая спираль домена HR1 и запуская взаимодействие между HR2 и HR1 с образованием шестиспирального пучка (6-HB), в результате чего вирусная оболочка и клеточная мембрана выстраиваются в непосредственной близости для слияния и проникновения вируса.

Разработка терапевтических препаратов на основе антивирусных пептидов

В связи с малыми размерами, высокой специфичностью, биодоступностью и стабильностью пептиды являются перспективными потенциальными препаратами для лечения коронавирусной инфекции. Синтез пептидов можно быстро осуществить. Однако пептиды легко подвергаются протеолитической деградации и характеризуются коротким периодом циркуляции в организме. Для решения этой проблемы пептиды модифицируют, укорачивая их последовательности, изменяя аминокислоты или добавляя фрагменты, спо-

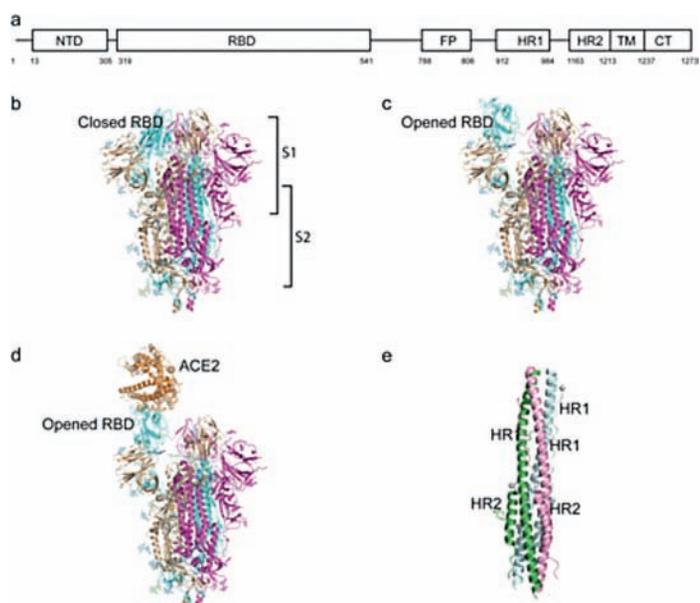


Рис. 3. Схематическое изображение шипа SARS-CoV-2: а) структурные единицы S-белка; б) состояние RBD «закрыто»; в) состояние RBD «открыто»; д) S-белок связывается с ACE2 с открытым RBD в субъединице S1; е) шестиспиральная структура, образованная HR1- и HR2-субъединицами S2 [6].

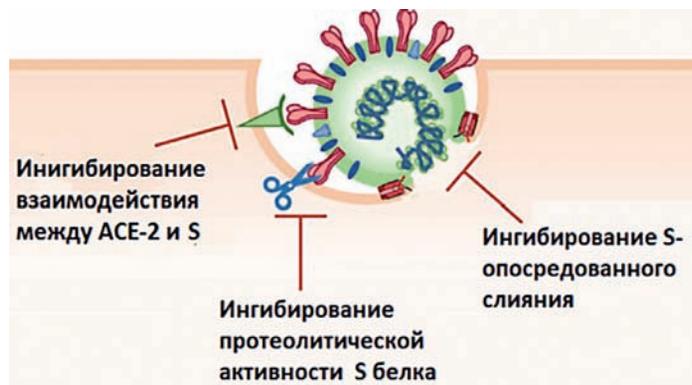


Рис. 4. Основные пути ингибирования SARS-CoV-2 [12].

способствующие увеличению их аффинности. При этом модификации могут быть внесены в относительно короткие сроки. Типичными модификациями являются пэггилирование (ковалентная модификация объектов фрагментами полиэтиленгликоля (ПЭГ)), которое увеличивает гидродинамический радиус пептидов, а также введение D- или не природных аминокислот, что способствует снижению протеолитической активности в отношении пептида [11].

Противовирусные пептиды обычно нацелены на структуры, необходимые для репликации вируса. Например, противовирусные пептиды могут быть направлены на вирусные белки, включая межбелковые взаимодействия, тем самым ингибируя их ферментативную активность, модулируя конформационные изменения, или влияя на белки-хозяева, которые необходимы для развития вирусной инфекции (например, рецепторы, участвующие в слиянии с вирусом, или протеазы, активирующие вирусные белки).

Терапевтическое действие разрабатываемых антивирусных пептидов, направленных против SARS-CoV-2, реализуется тремя ключевыми механизмами:

- предотвращение связывания фермента ACE2 эукариотической клетки и S-белка SARS-CoV-2;
- ингибирование активации протеолитической активности S-белка;

- ингибирование слияния между мембраной вирусной оболочки и мембраной эукариотической клетки.

Перечисленные механизмы представлены на рис. 4.

Рассмотрим более подробно разрабатываемые пептиды для борьбы с коронавирусной инфекцией.

Пептиды, предотвращающие связывание фермента ACE2 эукариотической клетки и S-белка SARS-CoV-2

Первый этап проникновения SARS-CoV-2 представлен формированием взаимодействия между вирусным S-белком и клеточным рецептором ACE2 (рис. 1b). Стратегия предотвращения проникновения вируса в клетку основана на ингибировании связывания RBD с рецептором ACE2. Пептиды могут быть получены из существующих белков-рецепторов, синтезироваться *de novo* на основании имеющихся последовательностей нативных белков или быть искусственно созданными. Примеры некоторых пептидов, способных ингибировать проникновение SARS-CoV-2, представлены в табл. 1.

Механизмы, позволяющие разработанным пептидам ингибировать проникновение вируса SARS-CoV-2, представлены на рис. 5.

Пептиды, нацеленные на домены в S-белке, отличные от RBD, также могут препятствовать проникновению вируса. Например, пептиды, связывающиеся с $\alpha 1$ -спиралью ACE2 белка, которая важна для взаимодействия SARS-CoV-2S1 / RBD (обозначено зеленым на рис. 5), способны ингибировать проникновение вируса [13]. Кроме пептидов, разработаны минипротеины, которые получены с использованием последовательностей ACE2 или синтезированы *de novo* [16].

ACE2 представляет собой мембранно-ассоциированную аминопептидазу. Этот фермент экспрессируется во многих органах и тканях (сердце, кровеносные сосуды, легкие, почки, кишечник, семенники, головной мозг). ACE2 является частью ренин-ангиотензиновой системы, которая отвечает за регуляцию артериального давления в организме. Коронавирусы SARS-CoV-1, HCoV-NL63 и SARS-CoV-2 используют ACE2 в качестве рецептора для проникновения в клетку. Одним из кандидатов в блокаторы фермента ACE2 является челове-

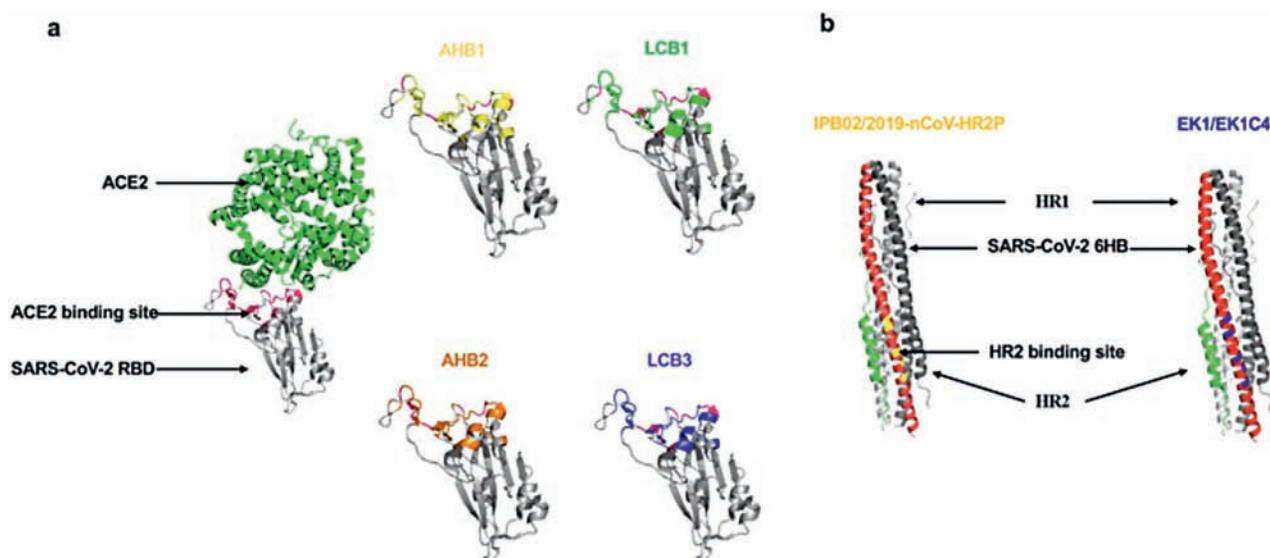


Рис. 5. Пептиды, нацеленные на S-белок SARS-CoV-2: а) пептиды, нацеленные на RBD: мишени для AHB1, AHB2, LCB1 и LCB3 показаны желтым, оранжевым, зеленым и синим цветом соответственно, в SARS-CoV-2 RBD; б) пептиды, нацеленные на 6-НВ: мишени для IPB02 и 2019-nCoV-HR2P перекрываются с сайтом связывания HR2, который окрашен в желтый цвет. Мишени ингибиторов слияния пан-CoV, пептидов EK1 и EK1C4 показаны синим цветом [20].

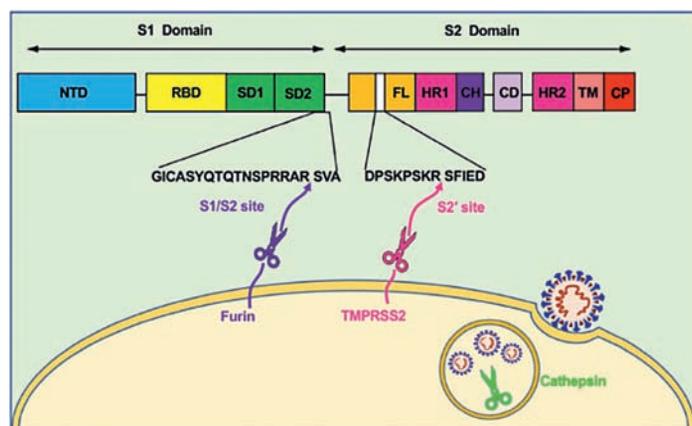


Рис. 6. Три категории протеаз, необходимых для слияния и проникновения SARS-CoV-2 [13]. Различные домены S-белка SARS-CoV-2 (слева направо): NTD, RBD, субдомен 1 (SD1), субдомен 2 (SD2), петля слияния (FL), HR1, центральная спираль (CH), коннекторный домен (CD), HR2, TM, цитоплазматический хвостовой домен (CP).

ский дефензин 5 (HD5), который является наиболее распространенным α -дефензином в кишечнике человека. Благодаря своей лектиноподобной активности HD5 связывает липиды и гликозилированные белки [21], что делает ACE2 и белок SARS-CoV-2S его потенциальными мишенями.

Пептиды, нацеленные на ингибирование активации протеолитического S-белка

Активация S-белка SARS-CoV-2 требует протеолитического расщепления на двух участках. На границе S1/S (682–685 а.о.) имеется сайт расщепления этих двух субъединиц фурином (фермент, сериновая протеаза клеток животных, по структуре напоминает бактериальный протеолитический фермент субтилизин), что имеет важное значение для жизненного цикла вируса и его патогенности. Следовательно, ингибиторы фурина могут использоваться в качестве лекарственной терапии SARS-CoV-2 [22].

В результате расщепления S-белка в сайте S1/S2 под влиянием фурина образуются две отдельные субъединицы,

остающиеся нековалентно связанными (рис. 6). Второй сайт находится в области S2/S2', в нем расщепление происходит с участием трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2, которая высвобождает белок слияния (FP) субъединицы S2. Внутриклеточные протеазы (лизосомальный катепсин L) могут активировать S-белок независимо от ферментативной активности фурина после эндосомного поглощения.

Следовательно, идентификация и конструирование пептидов, которые нарушают этот процесс, – одна из стратегий разработки терапевтических агентов против SARS-CoV-2. Для ингибирования этих протеаз получены пептиды, например камостата мезилат [23], блокирующий протеазу TMPRSS2, и e64d, который ингибирует катепсин L [24], что приводит к блокированию инфекции SARS-CoV-2. Разработаны пептидомиметики MI-432 и MI-1900, ингибирующие протеазу TMPRSS2 [28]. Ингибиторы MI-1852 и des-RVKR-смк нацелены на фурин и родственные белковые конвертазы, также получен ингибитор протеаз широкого спектра действия – апротинин [25, 26]. Тейкопланин – еще один из пептидов, нацеленных на цистеиновую протеиназу катепсина L [27].

Пептиды, нацеленные на ингибирование слияния мембран между вирусной оболочкой и клеточной мембраной

Для запуска инфекционного процесса вирусы SARS-CoV-2 должны проникнуть в клетки, что подразумевает этап слияния, опосредованный вирусным гликопротеином (S). Структура S-белка SARS-CoV-2 представлена пучком, состоящим из шести спиралей, образованных двумя доменами гептадных повторов (HR1 и HR2), соприкасающихся с вирусной и клеточной мембранами для слияния в S2-субъединице. Предыдущие исследования продемонстрировали, что пептиды, полученные из последовательности HR2, могут конкурентно связываться с вирусным доменом HR1, проявляя, таким образом, противовирусную активность. Например, пептид HR2, конъюгированный с холестерином на С-конце, названный IPB02, эффективно ингибирует слияние вируса с

Таблица 1. Пептиды, способные ингибировать проникновение SARS-CoV-2

Наименование	Описание	Последовательность
SBP1 [13]	23-мерный пептидный фрагмент α 1-домена пептидазы ACE2 (PD)	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS
AHB1 [14]	Пептид, полученный из ACE2	DEDLEELERLYRKAEEVAKAEKADARRGDDDERAKE QMERAMRLFDQVFEAQELQEKQTDGNRQKATHL DKAVKEAADELYQVRELEEQVMHVLDQVSELAH ELLHKLTEELERAAYFNWWATEMMLLEIKSDDER EIREIEEEARRILEHLEELARK
AHB2 [14]	Усеченный AHB1	ELEEQVMHVLDQVSELAHELLHKLTEELERAAYF NWWATEMMLLEIKSDDEREIREIEEEARRILEHLEE LARK
LCB1 [15]	Разработанный и синтезированный <i>de novo</i> минипротеин	DKEWILQKIYEIMRLLDELGHAEASMRVSDLIYEFM KKGDERLLEEAERLLEEVER
LCB3 [16]	Разработанный и синтезированный <i>de novo</i> минипротеин	NDELHMLMTDLVYEALHFADKDEEIKRQVQLFE LADKAYKNNDRQKLEKVVVEELKELLERLLS
IPB02 [17]	Пептид HR2 с добавленной к С-концу белковой молекулы холестериновой группой	ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLSLIDLQELK (Chol)
EK1 [18]	Получено из HR2 (OC43)	SLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEESYIDLKEL
EK1C4 [18]	Добавлена группа холестерина на С-конце EK1	SLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEESYIDLKELGSGSG-PEG4 (Chol)
2019-nCoV-HR2P [19]	Пептид HR2 (1150–1185)	DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLSLIDLQEL (aa1168–1203)

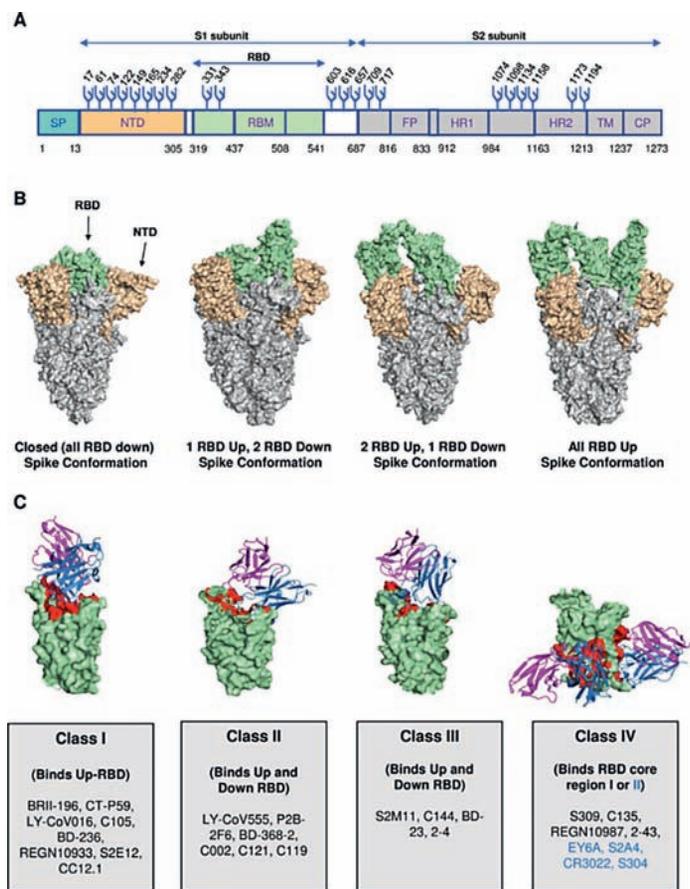


Рис. 7. Структура S-белка SARS-CoV-2, конформация и мишени для RBD-зависимых моноклональных антител (МКА, mAb) [30]: а) области S-белка SARS-CoV-2 с нумерацией аминокислотных положений, которые включают области домена S1: SP, NTD, RBD, а также области домена RBM и S2: FP, HR1 и HR2, TM и CP. Сайты гликозилирования пронумерованы и отмечены Y-образными структурами синего цвета; б) различные конформации S-белка (PDB: 7DF3, 6XKL, 7EB5 и 7KML, слева направо); в) 4 класса SARS-CoV-2 RBD-зависимых МКА. Обозначены переменная область тяжелой цепи антитела (голубой) и переменная область легкой цепи (пурпурный). Константные области антитела были удалены из связанного Fab-фрагмента для ясности. RBD показан бледно-зеленым цветом, а контакты антител на RBD отмечены красным (PDB ID: слева направо, 7CM4 (CT-P59), 7CHF (BD-368-2), 7K90 (C144) и 6R6X). (S304 (слева) и S309 (справа)). МКА, нацеленные на коровую область II RBD класса IV, показаны синим цветом. PDB – банк данных белков; SP – сигнальный пептид.

клеткой [17]. Различные модификации этого пептида путем введения гибкого линкера PEG8 в IPB02 между пептидной последовательностью и молекулой холестерина позволили получить ряд препаратов, характеризующихся повышенной растворимостью и увеличенным сродством связывания с пептидом HR1.

Показано, что мезилат нелфинавира (торговая марка Вирасепт), антиретровирусный препарат, используемый для лечения вируса иммунодефицита человека, подавляет как S-опосредованное межклеточное слияние SARS-CoV, так и SARS-CoV-2 [28]. Нелфинавир является первым зарегистрированным ингибитором слияния малых молекул в дополнение к ингибиторам слияния пептидов. Нелфинавир может подавлять функцию протеиназы TMPRSS2, участвующей в активации S-белка, что делает возможным клиническое при-

менение терапевтических средств против SARS-CoV-2, особенно на ранней стадии вирусной инфекции. При этом почти всегда нелфинавир используется в сочетании с другими антиретровирусными препаратами.

Разработка терапевтических препаратов на основе моноклональных антител

Основной мишенью нейтрализующих антител является S-белок SARS-CoV-2, в основном связывающийся либо с RBD, либо с NTD S-белка. S-белок может принимать различную конформацию внутри клетки-хозяина, и его статус основан на положении белка RBD: «верхнее» или «нижнее» (рис. 7b). В зависимости от эпитопа связывания RBD-нейтрализующие антитела подразделяют на 4 основных класса (I, II, III и IV). RBD-нейтрализующие антитела класса I и II взаимодействуют с областью связывания ACE2 или областью RBM RBD [29]. Эта область отвечает за первичный контакт с ACE2, инициирующий проникновение вируса [2].

Нейтрализующие антитела класса I связывают RBD только в «верхнем» положении и блокируют связывание ACE2, тогда как нейтрализующие антитела класса II блокируют связывание ACE2 и распознают как «верхнее», так и «нижнее» положение RBD (рис. 7b, 7c). Нейтрализующие антитела класса III блокируют сайт связывания ACE2, распознают спайковый белок как с «верхней», так и с «нижней» конформациями RBD и дополнительно могут взаимодействовать с соседними пептидами RBD. Нейтрализующие антитела класса IV связываются с консервативной областью в RBD (область ядра I) или RBD только в конформации «вверх» (область ядра II) (рис. 1с, 7b). Полное описание этих 4 классов RBD-зависимых МКА показано на рис. 7с. Антитела класса IV к коровой области I обладают широкой нейтрализующей активностью против SARS-CoV-2, его вариантов и других родственных коронавирусов [29, 31]. Совсем недавно были идентифицированы нейтрализующие антитела, нацеленные на новые эпитопы в домене S2 (область стержневой спирали) шипа, которые нейтрализуют не только вирусы, вызывающие SARS, но и другие коронавирусы человека (например, hCoV) [32–34].

МКА рассматриваются в качестве потенциальных лекарств для лечения и/или профилактики SARS-CoV-2. Наиболее перспективные препараты, разработанные на основе МКА, проходят клинические испытания (табл. 2).

Недавно было разработано несколько биспецифических нейтрализующих антител путем объединения цепей двух независимых неперекрывающихся антител [35, 36]. Биспецифические антитела нейтрализуют SARS-CoV-2 разных штаммов. Это свидетельствует о том, что эти антитела являются многообещающими экономически эффективными терапевтическими средствами следующего поколения против SARS-CoV-2.

Помимо противовирусных функций нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 необходимо учитывать важность роли Fc-части антител. В 2021 г. опубликовано исследование, в котором показано, что терапевтические антитела (REGN, Abbvie, AstraZeneca и Vir Biotechnology) с интактной областью Fc более эффективно снижают вирусную нагрузку и уменьшают уровень поражения легких экспериментальных животных по сравнению с нейтрализующими антителами без эффекторных функций Fc (мутация LALA-PG) [37]. Это

Таблица 2. Фазы клинических испытаний препаратов моноклональных антител против SARS-CoV-2

Наименование	Характеристика	Фаза клинических испытаний
JS016	Человеческое МКА	3
REGN-Cov2	Человеческое МКА	3
Ly38192535 (LYCoV55)	Человеческое МКА	2
BD-368-2 (BGB DXP593)	Человеческое МКА	1
AZD7442 (AZD8895+AZD1061)	Человеческое МКА	3
VIR7831, VIR7832	Человеческое МКА	3
HLX70	Человеческое МКА	1
HLX71	Рекомбинантный человеческий ACE-2-Fc слитый белок	1
APN01	Рекомбинантный человеческий ACE-2	2
TY027	Человеческое МКА	1
BR196	Человеческое МКА	1
BR198	Человеческое МКА	1
CT-P59	Человеческое МКА	1

связано с тем, что для оптимальной защиты Fc-рецептор должен проявить эффекторные функции в виде усиления антителозависимой клеточной цитотоксичности и антителозависимого клеточного фагоцитоза. Кроме того, Fc-опосредованная активация комплемента может проявлять широкий спектр иммуномодулирующих функций, при этом активация C1q-компонента комплемента приводит к опосредованной антителами активации комплемента и комплемент-зависимой цитотоксичности.

В настоящее время только три препарата МКА против SARS-CoV-2 имеют разрешения FDA (Управление по контролю за продуктами и лекарствами) на экстренное использование для лечения COVID-19 легкой и средней степени тяжести с лабораторно подтвержденным SARS-CoV-2 у негоспитализированных пациентов (но с высоким риском развития тяжелого заболевания и/или госпитализации):

- бамланивимаб и этесевимаб – нейтрализующие МКА, которые связываются с разными, но перекрывающимися эпитопами в белке RBD SARS-CoV-2;
- казиривимаб и имдевимаб – рекомбинантные человеческие МКА, которые связываются с перекрывающимися эпитопами S-белка RBD SARS-CoV-2;
- сотровимаб – МКА, первоначально полученное в 2003 г. от человека, перенесшего SARS-CoV. Сотровимаб нацелен на эпитоп в RBD белка-шипа, который является консервативным и гомологичным для SARS-CoV и SARS-CoV-2.

Заключение

Профилактика и лечение пандемии SARS-CoV-2 требует быстрой разработки эффективных вакцин и противовирусных препаратов для ограничения распространения вируса и связанных с ним летальных исходов. Разработка нейтрализующих антител и пептидов против S-белка SARS-CoV-2 – один из многообещающих подходов в борьбе с пандемией COVID-19. В ряду основных проблем при разработке вируснейтрализующих препаратов находится проблема спонтан-

ных мутаций вируса, которые могут приводить к снижению терапевтической эффективности. Для решения этой проблемы возможным подходом является создание антител и/или протеинов, нацеленных на консервативные эпитопы RBD, с широкими нейтрализующими свойствами. Комбинированная терапия, включающая несколько нейтрализующих антител и/или протеинов, – еще один способ сохранения вируснейтрализующей активности препарата.

В связи с этим разработка нейтрализующих вирус препаратов, направленных на несколько разных эпитопов S белка SARS-CoV-2, поиск консервативных участков или использование комбинированной терапии с множеством антител/протеинов является актуальным направлением и требует дополнительных исследований.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 3.1.3.

Financial support

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 3.1.3.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell*. 2020 May 21;78(4):779-784.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.022
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veales D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058. Epub 2020 Mar 9. Erratum in: *Cell*. 2020 Dec 10;183(6):1735.
- Xia S, Yan L, Xu W, Agrawal AS, Algaissi A, Tseng CK, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv*. 2019 Apr 10;5(4):eaav4580. DOI: 10.1126/sciadv.aav4580
- Krishnamoorthy S, Swain B, Verma RS, Gunthe SS. SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV viruses: an overview of origin, evolution, and genetic variations. *Virusdisease*. 2020 Oct 16;31(4):1-13. DOI: 10.1007/s13337-020-00632-9
- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*. 2003 Aug;77(16):8801-11. DOI: 10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003
- Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020 Jul 17;369(6501):330-333. DOI: 10.1126/science.abb9983
- Alamri SS, et al. Enhanced immunogenicity of a synthetic DNA vaccine expressing consensus SARS-CoV-2 Spike protein using needle-free immunization. DOI: 10.1101/2021.02.01.429219
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a

- Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052
10. Millet JK, Whittaker GR. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells. *Virology*. 2018 Apr;517:3-8. DOI: 10.1016/j.virol.2017.12.015
 11. Vagner J, Qu H, Hruba VJ. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Jun;12(3):292-6. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.03.009
 12. Schütz D, Ruiz-Blanco YB, Münch J, Kirchhoff F, Sanchez-Garcia E, Müller JA. Peptide and peptide-based inhibitors of SARS-CoV-2 entry. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020 Dec;167:47-65. DOI: 10.1016/j.addr.2020.11.007
 13. Zhang G, et al. The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein. *BioRxiv*. 2020.
 14. Baker D, et al. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *BioRxiv*. 2020.
 15. Case JB, Chen RE, Cao L, Ying B, Winkler ES, Goresnik I, et al. Ultrapotent miniproteins targeting the receptor-binding domain protect against SARS-CoV-2 infection and disease in mice. *bioRxiv [Preprint]*. 2021 Mar 1:2021.03.01.433110. DOI: 10.1101/2021.03.01.433110
 16. Cao L, Goresnik I, Coventry B, Case JB, Miller L, Kozodoy L, et al. *De novo* design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *Science*. 2020 Oct 23;370(6515):426-431. DOI: 10.1126/science.abd9909
 17. Zhu Y, Yu D, Hu Y, Wu T, Chong H, He Y. SARS-CoV-2-derived fusion inhibitor lipopeptides exhibit highly potent and broad-spectrum activity against divergent human coronaviruses. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Aug 3;6(1):294. DOI: 10.1038/s41392-021-00698-x
 18. Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*. 2020 Apr;30(4):343-355. DOI: 10.1038/s41422-020-0305-x
 19. Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jul;17(7):765-767. DOI: 10.1038/s41423-020-0374-2
 21. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jun 11;6(1):233. DOI: 10.1038/s41392-021-00653-w
 22. Wang C, Shen M, Gohain N, Tolbert WD, Chen F, Zhang N, et al. Design of a potent antibiotic peptide based on the active region of human defensin 5. *J Med Chem*. 2015 Apr 9;58(7):3083-93. DOI: 10.1021/jm501824a
 23. Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol*. 2021 Jul;6(7):899-909. DOI: 10.1038/s41564-021-00908-w
 24. Engin S, et al. 2021. Covid-19 Tedavisinde İlaçta Yeniden Konumlandırma: Çeşitli İlaçların Proteaz İnhibitörü Aktivitelerinin in vitro Araştırılması. *Uluslararası Sağlık Araştırmaları Kongresi (ICOHER'21)*, (Balıkesir, Turkey), P. 222-232.
 25. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020 Mar 27;11(1):1620. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9. Erratum in: *Nat Commun*. 2021 Apr 1;12(1):2144.
 26. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Van Lam van T, Pilgram O, Moulton H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance*. 2020 Jul 23;3(9):e202000786. DOI: 10.26508/lsa.202000786
 27. Cheng YW, Chao TL, Li CL, Chiu MF, Kao HC, Wang SH, et al. Furin inhibitors block SARS-CoV-2 spike protein cleavage to suppress virus production and cytopathic effects. *Cell Rep*. 2020 Oct 13;33(2):108254. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108254
 28. Yu F, et al. Glycopeptide antibiotic teicoplanin inhibits cell entry of SARS-CoV-2 by suppressing the proteolytic activity of cathepsin L. DOI: 10.1101/2020.02.05.935387
 29. Musarrat F, Chouljenko V, Dahal A, Nabi R, Chouljenko T, Jois SD, et al. The anti-HIV drug nelfinavir mesylate (Viracept) is a potent inhibitor of cell fusion caused by the SARS-CoV-2 spike (S) glycoprotein warranting further evaluation as an antiviral against COVID-19 infections. *J Med Virol*. 2020 Oct;92(10):2087-2095. DOI: 10.1002/jmv.25985
 30. Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, Dam KA, Esswein SR, Gristick HB, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*. 2020 Dec;588(7839):682-687. DOI: 10.1038/s41586-020-2852-1
 31. Kumar S, Chandele A, Sharma A. Current status of therapeutic monoclonal antibodies against SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*. 2021 Sep 3;17(9):e1009885. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009885
 32. Pinto D, Park YJ, Beltramello M, Walls AC, Tortorici MA, Bianchi S, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*. 2020 Jul;583(7815):290-295. DOI: 10.1038/s41586-020-2349-y
 33. Song G, He WT, Callaghan S, Anzanello F, Huang D, Ricketts J, et al. Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 Sep 23:2020.09.22.308965. DOI: 10.1101/2020.09.22.308965
 34. Wang C, van Haperen R, Gutiérrez-Álvarez J, Li W, Okba NMA, Albulescu I, et al. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies. *Nat Commun*. 2021 Mar 17;12(1):1715. DOI: 10.1038/s41467-021-21968-w
 35. Sauer MM, Tortorici MA, Park YJ, Walls AC, Homad L, Acton OJ, et al. Structural basis for broad coronavirus neutralization. *Nat Struct Mol Biol*. 2021 Jun;28(6):478-486. DOI: 10.1038/s41594-021-00596-4
 36. De Gasparo R, Pedotti M, Simonelli L, Nickl P, Muecksch F, Cassaniti I, et al. Bispecific IgG neutralizes SARS-CoV-2 variants and prevents escape in mice. *Nature*. 2021 May;593(7859):424-428. DOI: 10.1038/s41586-021-03461-y. Epub 2021 Mar 25. Erratum in: *Nature*. 2021 Sep;597(7874):E2.
 37. Cho H, Gonzales-Wartz KK, Huang D, Yuan M, Peterson M, Liang J, et al. Ultrapotent bispecific antibodies neutralize emerging SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv [Preprint]*. 2021 Apr 1:2021.04.01.437942. DOI: 10.1101/2021.04.01.437942. Update in: *Sci Transl Med*. 2021 Oct 20;13(616):eabj5413.
 38. Winkler ES, Gilchuk P, Yu J, Bailey AL, Chen RE, Zost SJ, et al. Human neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 require intact Fc effector functions and monocytes for optimal therapeutic protection. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 Dec 28:2020.12.28.424554. DOI: 10.1101/2020.12.28.424554. Update in: *Cell*. 2021 Feb 12.

Информация об авторах:

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью (ученый секретарь) 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) 36-0069
E-mail: kolombet@obolensk.org

Шемьякин Игорь Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе 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) 36-0060
E-mail: shemyakin@obolensk.org

Information about authors:

Lubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Science), Scientific Secretary, Head of Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0069
E-mail: kolombet@obolensk.org

Igor G. Shemyakin, PhD, DSc (Biological Science), Professor, Deputy Director for Research, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0060
E-mail: shemyakin@obolensk.org

Серодиагностика эпидемически значимых для Российской Федерации инфекционных заболеваний

А.А.Горбатов, П.В.Соловьев, Е.В.Баранова, С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов

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

Постоянные вспышки и эпидемии вирусных заболеваний являются одними из главных проблем здравоохранения как в мире, так и в Российской Федерации. Метод полимеразной цепной реакции, который является золотым стандартом при постановке диагноза при вирусном заболевании, по ряду причин может давать ложноотрицательные результаты. Для повышения эффективности клинической диагностики как дополнительные средства широко применяются серологические скрининги. Использование иммунологических методов дает ряд преимуществ, таких как низкая стоимость анализа, более короткое время постановки, простота проведения анализа, возможность применения в лабораториях с минимальным оснащением, в том числе полевых и передвижных. В обзоре рассматриваются современные высокочувствительные и высокоспецифичные методы серодиагностики: иммуноферментный, иммунохроматографический, хемилюминесцентный и иммунофлуоресцентный анализы.

Ключевые слова: серодиагностика инфекционных заболеваний, иммуноферментный, иммунохроматографический, хемилюминесцентный и иммунофлуоресцентный анализы

Для цитирования: Горбатов А.А., Соловьев П.В., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Бикетов С.Ф. Серодиагностика эпидемически значимых для Российской Федерации инфекционных заболеваний. Бактериология. 2021; 6(4): 56–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-56-61

Serodiagnostics of infectious diseases epidemically significant for the Russian Federation

A.A.Gorbatov, P.V.Soloviev, E.V.Baranova, S.G.Ignatov, S.F.Biketov

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

Constant outbreaks and epidemics of viral diseases are one of the main health problems both in the world and in the Russian Federation. The PCR method, which is the «gold standard» for the diagnosis of a viral disease, can give false negative results for a number of reasons. To increase the efficiency of clinical diagnostics, serological screenings are widely used as additional means. The use of immunological methods combines several advantages, such as low cost of analysis, shorter staging time, ease of analysis, it can be used in laboratories with minimal equipment, including field and mobile conditions. The review examines modern highly sensitive and highly specific serodiagnostic methods: enzyme-linked immunosorbent assay, lateral flow immunoassay, chemiluminescence immunoassay and immunofluorescence immunoassay.

Key words: serodiagnosis of infectious diseases, enzyme immunoassay, immunochromatographic, chemiluminescent and immunofluorescent analyzes

For citation: Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Ignatov S.G., Biketov S.F. Serodiagnostics of infectious diseases epidemically significant for the Russian Federation. Bacteriology. 2021; 6(4): 56–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-56-61

Изменение окружающей среды, потепление климата, увеличение плотности населения и другие факторы провоцируют появление эпидемически значимых для Российской Федерации (РФ) инфекционных заболеваний. Для успешной борьбы и быстрой детекции иммунного ответа к таким заболеваниям необходимы быстрые и чувстви-

тельные тесты. Серодиагностические методы являются удобными, быстрыми, высокочувствительными и высокоспецифичными, часто не требующими специального дорогого оборудования. Большинство серологических методов основаны на принципе специфического связывания антигена с антителом. Основные из них: иммуноферментный анализ

Для корреспонденции:

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов 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) 36-0065
E-mail: gorbatov1986@mail.ru

Статья поступила 06.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Aleksey A. Gorbatov, MD, PhD, Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065
E-mail: gorbatov1986@mail.ru

The article was received 06.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

(ИФА), иммунохроматографический анализ (ИХА), хемилюминесцентный анализ (ХЛА) и иммунофлуоресцентный анализ (МФА) [1]. Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки, связанные с эффективностью обнаружения, стоимостью анализа, удобством эксплуатации и ограничениями при диагностике [2].

Иммуноферментный анализ. ИФА является наиболее часто используемым классическим серологическим тестом со временем проведения от 2 до 8 ч [3]. Он был изобретен в 1960-х гг. и широко используется по настоящее время [4]. В зависимости от целей и задач ИФА можно разделить на сэндвич-ИФА, непрямой ИФА, ИФА с двойным антителом, конкурентный ИФА, блокирующий ИФА и другие различные типы [5].

Хемилюминесцентный анализ. Принцип ХЛА аналогичен принципу ИФА, использующему преимущества высокого сродства к связыванию между вирусными антигенами и антителами хозяина, но разница в том, что ХЛА использует химическую реакцию для получения светящегося химического зонда для обнаружения положительного сигнала [6]. Как правило, результаты ХЛА получаются за 0,5–2 ч [7]. В настоящее время точность теста ХЛА часто выше, чем у других методов.

Иммунохроматографический анализ. ИХА – это недорогой, простой, быстрый и портативный тест. Для получения результата анализа этим быстрым методом диагностики требуется всего от 5 до 30 мин, а также небольшое количество исследуемого образца, не требуется дополнительного оборудования, можно использовать как в лабораториях медицинских учреждений, так и самостоятельно в домашних условиях [8]. Для анализа в формате ИХА можно использовать различные биологические жидкости (сыворотку, плазму, цельную кровь, мочу, слюну, слезы) [9].

Иммунофлуоресцентный анализ. МФА и ИФА имеют схожие способы обнаружения, за исключением того, что результаты теста МФА показаны с помощью флуоресцентной микроскопии. Более того, для МФА требуется, чтобы люди наблюдали за интенсивностью флуоресценции клеток под микроскопом, что делает результаты в определенной степени субъективными [10]. Из-за этих недостатков тест МФА не получил широкого применения в серологической диагностике.

Было проведено сравнение диагностических показателей (чувствительность и специфичность) различных серологических методов. Показано, что ИФА был менее чувствительным, чем ХЛА, но более чувствительным, чем ИХА, при диагностике COVID-19 [11], что означает, что тест ХЛА более эффективен для диагностики ранних инфицированных пациентов с низкой концентрацией антител. Специфичность ХЛА и ИХА была аналогичной, но общая специфичность ХЛА была немного выше, чем у двух других методов.

Основные эпидемиологически значимые вирусные заболевания

На сегодняшний день медицинской науке известны механизмы возникновения новых вирусных инфекций, изучены клинико-эпидемиологические особенности «птичьего» гриппа H5N1 (2007 г.), «свиного» гриппа A/H1N1/pdm (2009), тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-nCoV, 2002 г.), ближневосточного коронавирального синдрома

(MERS-CoV, 2015 г.), крупнейшей вспышки болезни Эбола в Западной Африке (2014–2015 гг.), вспышки лихорадки Зика (2016 г.).

Грипп – одно из наиболее агрессивных и непредсказуемых заболеваний, стоящее особняком в ряду известных острых респираторных вирусных инфекций. Первая пандемия гриппа XXI века была объявлена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в июне 2009 г. и завершилась в августе 2010 г. По оценкам ВОЗ, в 2009 г. от вируса гриппа скончалось 18 449 человек. В это число вошли только случаи лабораторно подтвержденных заражений вирусом H1N1.

Пандемия, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, приводит к драматическим медицинским, социальным и экономическим последствиям во всем мире. Несмотря на множество стратегий общественного здравоохранения, включая изоляцию, социальное дистанцирование, широкое использование масок и гигиену рук, эпидемиологическая ситуация в мире остается напряженной. На ноябрь 2021 г. число заболевших во всем мире составило более 200 млн человек, в России зарегистрировано более 9,5 млн подтвержденных случаев COVID-19.

Человечество сталкивается с коронавирусами зоонозной природы уже в третий раз. В 2002 г. в китайской провинции Гуандун впервые была зарегистрирована атипичная пневмония, вызванная вирусом SARS-CoV, что привело в 2003 г. к глобальной пандемии с 10%-й летальностью [12]. Это заболевание с 2004 г. у людей не регистрируется. В 2012 г. в Саудовской Аравии был зарегистрирован другой коронавирус – MERS-CoV, который продолжает заражать людей с ограниченной передачей инфекции от человека к человеку и встречается примерно в 27 странах. Природным резервуаром обоих коронавирусов являются летучие мыши, которые передают возбудителя промежуточным хозяевам (пальмовым цветкам для SARS-CoV и верблюдам-дромадерам для MERS-CoV), что, в свою очередь, приводит к заражению людей [13].

В отличие от SARS-CoV и MERS-CoV SARS-CoV-2, зарегистрированный в Ухане (Китай) в декабре 2019 г., характеризуется быстрым распространением и вирулентной передачей от человека к человеку [13], что привело к глобальной пандемии при летальности в среднем около 4% [14], не завершившейся до настоящего времени. SARS-CoV-2 также является зоонозным вирусом с летучими мышами в качестве его естественного резервуара [13], но промежуточные хозяева не идентифицированы [15].

Диагностика возбудителей вирусных заболеваний

Рассмотрим серологическую диагностику на примере новой коронавирусной инфекции. Согласно временным методическим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (версия 9 от 26.10.2020), методы тестирования на антитела к вирусу SARS-CoV-2 рекомендуются использовать в следующих случаях:

- в качестве дополнительного метода диагностики острой инфекции (с учетом серонегативного периода) или при невозможности исследования мазков методом амплификации нуклеиновых кислот, в том числе при госпитализации в стационар по поводу соматической патологии;

- для выявления лиц с бессимптомной формой инфекции;
- для установления факта перенесенной ранее инфекции при обследовании групп риска и проведении массового обследования населения для оценки уровня популяционного иммунитета;
- для отбора потенциальных доноров иммунокомпетентной плазмы.

В связи с ростом массовой вакцинации населения определение уровня антител можно использовать для оценки напряженности поствакцинального иммунитета. Определение антител к разным антигенам возбудителя позволит дифференцировать иммунный ответ после вакцинации и перенесенной инфекции [16].

Метод непрямого ИФА чаще всего используется в серологических исследованиях при обнаружении антител к возбудителю новой коронавирусной инфекции. Основным процессом этого метода заключается в нанесении вирусного белка (N, S), субъединицы белка S (S1) или домена белка (RBD) на твердофазный носитель, который связывается с антителами сыворотки и антителами, связанными с ферментами, для получения хромогенной реакции [17]. В настоящее время на рынке существует множество коммерческих наборов для обнаружения SARS-CoV-2, нацеленных на различные типы антигенов и антител [18]. На территории РФ зарегистрировано более 10 тест-систем в данном формате. Поскольку процесс проведения ИФА относительно сложен [19], некоторые разработчики пытаются применить другие форматы тестов, чтобы сократить время анализа и повысить чувствительность [20].

Основной процесс обнаружения методом МФА заключается в фиксации инфицированных SARS-CoV-2 клеток животных (таких как клетки Vero), инкубированных с сывороткой пациента на предметном стекле. Для реакции требуется живой вирус SARS-CoV-2 в клетках, следовательно, повышается потенциальный риск заражения.

Высокий уровень и стабильность передачи острых респираторных вирусных инфекций, тяжесть заболевания в группах высокого риска – все это способствует пандемии, которая бросает вызов многим системам здравоохранения. Следовательно, понимание и внедрение эффективного тестирования, основанного на фактических данных, является краеугольным камнем для правильного выявления случаев, прогнозирования клинических исходов и разработки стратегий лечения.

Анализ полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используемые для выявления наличия вирусного генетического материала, стали золотым стандартом диагностики. Однако было продемонстрировано, что методы экстракции РНК, «короткое окно» чувствительности к ОТ-ПЦР после появления симптомов и переменные уровни вирусной нагрузки приводят к ложноотрицательным результатам [21, 22]. Поэтому внедрение иммунологического анализа на антитела представляет значительный интерес как возможность повысить точность диагностики в различных случаях. В современной литературе описано более 200 иммунологических анализов, доступных по всему миру [23–25]. Понимание сильных и слабых сторон этих анализов в различных клинических и исследовательских сценариях имеет решающее значение для дальнейшего использования серологического тестирования на эпидемиологически значимые вирусные инфекции.

Иммунодоминантные антигены вируса SARS-CoV2, используемые в серологических тестах

У большинства людей после контакта с SARS-CoV-2 развивается специфический иммунный ответ. Выделяют четыре основных иммуногенных белка SARS-CoV-2, которые используются при разработке большинства коммерческих тестов для обнаружения антител к SARS-CoV-2.

Нуклеокапсидный (NC) антиген. Является самым распространенным вирусным фосфопротеином, синтезируемым и выделяемым при инфицировании новым коронавирусом. Он участвует в репликации вирусного генома, сборке вирусных частиц и играет важную роль в синтезе вирусной РНК. N-антиген обладает сильной иммуногенностью в раннем периоде заболевания [26].

Спайковый (S) антиген. Представляет собой крупный гликопротеин, состоящий из двух субъединиц (S1 и S2), образующих протеиновый тример на мембране вируса. S1-субъединица формирует головку S-белка, и в ее С-концевой области располагается рецептор-связывающий домен, а в S2-субъединице – пептид слияния, к которому прилегают трансмембранный и цитоплазматический домены [26].

Рецептор-связывающий домен (RBD). RBD используется вирусом для проникновения в клетки хозяина путем связывания с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 на клетке человека. Обнаружение антител против S-белка, а особенно выявление антител к RBD-антигену, дает информацию об эффективном гуморальном ответе. Большинство вируснейтрализующих антител направлены против RBD SARS-CoV-2, а обнаружение иммуноглобулинов против RBD при COVID-19 имеет высокую корреляцию со способностью плазмы нейтрализовать вирус [27].

Влияние антигенов SARS-CoV-2 на уровень антител к данному возбудителю

Показано, что чувствительность тестов, базирующихся на антителах к N-антигену (51%), выше по сравнению с возможностью обнаружения антител к S-антигену (43%) в раннем периоде сероконверсии (до 14-го дня от появления симптомов) COVID-19 [28]. Есть версия, что у иммунокомпromетированных пациентов вероятность обнаружения антител к N-белку может быть выше, чем возможность получить положительные результаты на анти-S-тестах [29]. В своей работе J.Van Elslande et al. проводили сравнение времени появления положительного результата на антитела при COVID-19 в период до 3 нед. от момента появления симптомов заболевания. Было установлено, что иммуноглобулины к N-антигену становятся доступными для выявления в среднем на 2 дня раньше, чем иммуноглобулины к S-белку [30]. Аналогичная закономерность была установлена у пациентов с SARS в 2003 г., когда было обнаружено, что сероконверсия иммуноглобулинов к N-белкам наступала раньше, чем выявлялись антитела к S-белку [31]. Вне зависимости от антигенной мишени чувствительность тестов на антитела к SARS-CoV-2 достигает максимальных значений к 15–21-му дню появления симптомов заболевания. В крупных исследованиях частота сероконверсии колеблется от 91 до 99% [32].

Оценка долговечности титров циркулирующих антител проводилась в группе пациентов с подтвержденными случая-

ми COVID-19. Исследуемая когорта была составлена из пациентов с бессимптомным, легким, умеренным и тяжелым течением COVID-19, наблюдение продолжалось с 6-го по 240-й день после появления симптомов заболевания. Титры анти-S-антител к SARS-CoV-2 были относительно стабильны от 20-го до 240-го дня, период их полувыведения составил 140 дней (95% ДИ: 89–325), в то время как кинетика иммуноглобулинов к N-антигену SARS-CoV-2 в течение 8 мес. обнаружила более короткий период полувыведения – 68 дней (95% ДИ: 50–106). Для титров антител к RBD SARS-CoV-2 расчетный период полувыведения составил 83 дня (95% ДИ: 62–126) [33].

Также были проведены исследования по анализу иммуноглобулинов А, М, G. Клиническое значение IgA при SARS-CoV-2 установлено недостаточно. Было показано, что появление IgM как раннего маркера инфицирования не обязательно. Во множестве исследований было показано, что особенностью иммунологического ответа на новую коронавирусную инфекцию является небольшой временной промежуток между появлением антител IgM и IgG, а иногда и одновременное их формирование [34]. Иммуноглобулины IgM элиминируются быстрее, чем IgG [35]. Показано, что уровень общего IgM относительно низкий в 1-ю неделю, постепенно увеличивается к 5-й неделе, после чего следует непрерывное снижение до исходного уровня в течение 12 нед. (предел наблюдения). Уровень общего IgG выше, чем IgM в течение 1-й недели и непрерывно увеличивается до 5-й недели, сохраняя плато до 7-й недели, а затем постепенно наблюдалось снижение с 8-й недели, но в конце 12-й недели уровень все еще был значительно повышен [36]. Динамика антител у отдельных пациентов индивидуальна, описаны случаи, когда у пациентов с COVID-19 иммунный ответ реализовался только с участием IgM без синтеза IgG [35]. Поэтому можно сделать вывод, что тесты, которые определяют как IgM, так и IgG, выглядят более чувствительными, чем тесты для отдельных иммуноглобулинов [37].

При изучении иммунитета к возбудителям эпидемически значимых вирусных инфекций для РФ серодиагностика данных заболеваний играет ключевую роль. До сих пор остается неясным, являются ли высокие уровни антител надежной защитой от последующего реинфицирования. Весьма интересным остается вопрос времени сероконверсии и длительности промежутка между появлением клинических симптомов и выработкой антител. Необходимо продолжать исследования по мониторингу напряженности гуморального иммунитета к вирусным инфекциям для более глубокого понимания динамики иммунного ответа, усовершенствования вакцин и профилактики. Поэтому разработка отечественных качественных, высокочувствительных и высокоспецифичных серологических тест-систем является актуальным вопросом диагностики.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 1.1.17.

Funding information

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 1.1.17.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Ejazi SA, Ghosh S, Ali N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. *Immunol Cell Biol.* 2021 Jan;99(1):21-33. DOI: 10.1111/imcb.12397
2. Kubina R, Dziedzic A. Molecular and Serological Tests for COVID-19 a Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics (Basel).* 2020 Jun 26;10(6):434. DOI: 10.3390/diagnostics10060434
3. Mekonnen D, Mengist HM, Derbie A, Nibret E, Munshea A, He H, Li B, Jin T. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2021 May;31(3):e2181. DOI: 10.1002/rmv.2181
4. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2415-8. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532
5. Butler JE. Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay.* 2000 May-Aug;21(2-3):165-209. DOI: 10.1080/01971520009349533
6. Lin SB, Zheng ZX, Zhang R. [Application and Evaluation of Chemiluminescence Immunoassay in Blood Screening]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2019 Apr;27(2):569-572. Chinese. DOI: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.02.042
7. Vashist SK. *In Vitro* Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics (Basel).* 2020 Apr 5;10(4):202. DOI: 10.3390/diagnostics10040202
8. Ang SH, Rambeli M, Thevarajah TM, Alias YB, Khor SM. Quantitative, single-step dual measurement of hemoglobin A1c and total hemoglobin in human whole blood using a gold sandwich immunochromatographic assay for personalized medicine. *Biosens Bioelectron.* 2016 Apr 15;78:187-193. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.045
9. Bever CS, Adams CA, Hnasko RM, Cheng LW, Stanker LH. Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms. *PLoS One.* 2020 Apr 17;15(4):e0231781. DOI: 10.1371/journal.pone.0231781
10. Goudouris ES. Laboratory diagnosis of COVID-19. *J Pediatr (Rio J).* 2021 Jan-Feb;97(1):7-12. DOI: 10.1016/j.jpeds.2020.08.001
11. Gong F, Wei HX, Li Q, Liu L, Li B. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. *Front Mol Biosci.* 2021 Jul 23;8:682405. DOI: 10.3389/fmolb.2021.682405
12. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV – a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Mar;7(3):226-36. DOI: 10.1038/nrmicro2090
13. Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. *Expert Opin Ther Targets.* 2017 Feb;21(2):131-143. DOI: 10.1080/14728222.2017.1271415
14. Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 31;9(1):275-277. DOI: 10.1080/22221751.2020.1723441. Erratum in: *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):539.
15. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020 Mar 27;11(1):1620. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9. Erratum in: *Nat Commun.* 2021 Apr 1;12(1):2144.
16. Rémi Vernet, Emily Charrier, Julien Grogg and Nicolas Quantitative ELISA Protocol for Detection of Specific Human IgG against the SARS-CoV-2 Spike Protein Mach, MDPI, Vaccines, 9 July 2021, 9, 770.
17. Lin AV. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:51-9. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5_5

18. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN, et al. Test Performance Evaluation of SARS-CoV-2 Serological Assays. medRxiv. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.25.20074856
19. Sidiq Z, Hanif M, Dwivedi KK, Chopra KK. Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection. Indian J Tuberc. 2020 Dec;67(4S):S163-S166. DOI: 10.1016/j.ijtb.2020.07.034
20. Manalac J, Yee J, Calayag K, Nguyen L, Patel PM, Zhou D, Shi RZ. Evaluation of Abbott anti-SARS-CoV-2 CMIA IgG and Euroimmun ELISA IgG/IgA assays in a clinical lab. Clin Chim Acta. 2020 Nov;510:687-690. DOI: 10.1016/j.cca.2020.09.002
21. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, Yang C. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. J Med Virol. 2020 Jul;92(7):903-908. DOI: 10.1002/jmv.25786
22. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. Clin Infect Dis. 2020. ciaa461. DOI: 10.1093/cid/ciaa461
23. Lee CY, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. Front Immunol. 2020 Apr 24;11:879. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00879
24. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. Ann Intern Med. 2020 Jun 2;172(11):726-734. DOI: 10.7326/M20-1301
25. Villalta D, Martelli P, Moratto A, Salgarolo V, Ligato E, Conte M, et al. Diagnostic performance of an automated chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies detection: A real life experience. Pract Lab Med. 2021 May;25:e00227. DOI: 10.1016/j.plabm.2021.e00227
26. Li D, Li J. Immunologic Testing for SARS-CoV-2 Infection from the Antigen Perspective. J Clin Microbiol. 2021 Apr 20;59(5):e02160-20. DOI: 10.1128/JCM.02160-20
27. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson WH, et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. Cell Rep Med. 2020 Jun 23;1(3):100040. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100040
28. Берестовская ВС, Вавилова ТВ, Губанова АВ, Черныш НЮ. Ключевые характеристики тестов для определения антител к SARS-CoV-2. Медицинский алфавит. 2021;13:13-17. DOI: 10.33667/2078-5631-2021-13-13-17
29. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. medRxiv [Preprint]. 2020 Apr 24:2020.04.20.20071423. DOI: 10.1101/2020.04.20.20071423. Update in: J Infect Dis. 2020 May 19.
30. Van Elslande J, Decru B, Jonckheere S, Van Wijngaerden E, Houben E, Vandecandelaere P, et al. Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by four automated immunoassays and three ELISAs. Clin Microbiol Infect. 2020 Nov;26(11):1557.e1-1557.e7. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.07.038
31. Woo PC, Lau SK, Wong BH, Tsoi HW, Fung AM, Kao RY, et al. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and SARS coronavirus nucleocapsid protein ELISA for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3054-8. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3054-3058.2005
32. Kaufman HW, Chen Z, Meyer WA 3rd, Wohlgemuth JG. Insights from Patterns of SARS-CoV-2 Immunoglobulin G Serology Test Results from a National Clinical Laboratory, United States, March–July 2020. Popul Health Manag. 2021 Feb;24(S1):S35-S42. DOI: 10.1089/pop.2020.0256
33. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to eight months after infection. Science. 2021 Feb 5;371(6529):eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063
34. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020 Jun 9;323(22):2249-2251. DOI: 10.1001/jama.2020.8259
35. Petersen LR, Sami S, Vuong N, Pathela P, Weiss D, Morgenthau BM, et al. Lack of antibodies to SARS-CoV-2 in a large cohort of previously infected persons. Clin Infect Dis. 2021 Nov 2;73(9):e3066-e3073. DOI: 10.1093/cid/ciaa1685
36. Li K, Huang B, Wu M, Zhong A, Li L, Cai Y, et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID 19. Nat Commun. 2020 Nov 27;11(1):6044. DOI: 10.1038/s41467-020-19943-y
37. Колупаев ВЕ, Тарасенко ОА. Критерии выбора серологических тестов в лабораторной диагностике COVID-19. Вестник Росздравнадзора. 2020;6:53-61. DOI: 10.35576/2070-7940-2020-5-1-73-78

References

1. Ejazi SA, Ghosh S, Ali N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. Immunol Cell Biol. 2021 Jan;99(1):21-33. DOI: 10.1111/imcb.12397
2. Kubina R, Dziedzic A. Molecular and Serological Tests for COVID-19 a Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. Diagnostics (Basel). 2020 Jun 26;10(6):434. DOI: 10.3390/diagnostics10060434
3. Mekonnen D, Mengist HM, Derbie A, Nibret E, Munsha A, He H, Li B, Jin T. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. Rev Med Virol. 2021 May;31(3):e2181. DOI: 10.1002/rmv.2181
4. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clin Chem. 2005 Dec;51(12):2415-8. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532
5. Butler JE. Enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunoassay. 2000 May-Aug;21(2-3):165-209. DOI: 10.1080/01971520009349533
6. Lin SB, Zheng ZX, Zhang R. [Application and Evaluation of Chemiluminescence Immunoassay in Blood Screening]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2019 Apr;27(2):569-572. Chinese. DOI: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.02.042
7. Vashist SK. *In Vitro* Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. Diagnostics (Basel). 2020 Apr 5;10(4):202. DOI: 10.3390/diagnostics10040202
8. Ang SH, Rambeli M, Thevarajah TM, Alias YB, Khor SM. Quantitative, single-step dual measurement of hemoglobin A1c and total hemoglobin in human whole blood using a gold sandwich immunochromatographic assay for personalized medicine. Biosens Bioelectron. 2016 Apr 15;78:187-193. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.045
9. Bever CS, Adams CA, Hnasko RM, Cheng LW, Stanker LH. Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms. PLoS One. 2020 Apr 17;15(4):e0231781. DOI: 10.1371/journal.pone.0231781
10. Goudouris ES. Laboratory diagnosis of COVID-19. J Pediatr (Rio J). 2021 Jan-Feb;97(1):7-12. DOI: 10.1016/j.jpeds.2020.08.001
11. Gong F, Wei HX, Li Q, Liu L, Li B. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. Front Mol Biosci. 2021 Jul 23;8:682405. DOI: 10.3389/fmolb.2021.682405
12. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV – a target for vaccine and therapeutic development. Nat Rev Microbiol. 2009 Mar;7(3):226-36. DOI: 10.1038/nrmicro2090
13. Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. Expert Opin Ther Targets. 2017 Feb;21(2):131-143. DOI: 10.1080/14728222.2017.1271415
14. Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. Emerg Microbes Infect. 2020 Jan 31;9(1):275-277. DOI: 10.1080/22221751.2020.1723441. Erratum in: Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):539.
15. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. Nat Commun. 2020 Mar 27;11(1):1620. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9. Erratum in: Nat Commun. 2021 Apr 1;12(1):2144.

16. Rémi Vernet, Emily Charrier, Julien Grogg and Nicolas Quantitative ELISA Protocol for Detection of Specific Human IgG against the SARS-CoV-2 Spike Protein Mach, MDPI, Vaccines, 9 July 2021, 9, 770.
17. Lin AV. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:51-9. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5_5
18. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN, et al. Test Performance Evaluation of SARS-CoV-2 Serological Assays. *medRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.04.25.20074856
19. Sidiq Z, Hanif M, Dwivedi KK, Chopra KK. Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection. *Indian J Tuberc.* 2020 Dec;67(4S):S163-S166. DOI: 10.1016/j.ijtb.2020.07.034
20. Manalac J, Yee J, Calayag K, Nguyen L, Patel PM, Zhou D, Shi RZ. Evaluation of Abbott anti-SARS-CoV-2 CMIA IgG and Euroimmun ELISA IgG/IgA assays in a clinical lab. *Clin Chim Acta.* 2020 Nov;510:687-690. DOI: 10.1016/j.cca.2020.09.002
21. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, Yang C. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol.* 2020 Jul;92(7):903-908. DOI: 10.1002/jmv.25786
22. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020. ciaa461. DOI: 10.1093/cid/ciaa461
23. Lee CY, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Front Immunol.* 2020 Apr 24;11:879. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00879
24. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020 Jun 2;172(11):726-734. DOI: 10.7326/M20-1301
25. Villalta D, Martelli P, Moratto A, Salgarolo V, Ligato E, Conte M, et al. Diagnostic performance of an automated chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies detection: A real life experience. *Pract Lab Med.* 2021 May;25:e00227. DOI: 10.1016/j.plabm.2021.e00227
26. Li D, Li J. Immunologic Testing for SARS-CoV-2 Infection from the Antigen Perspective. *J Clin Microbiol.* 2021 Apr 20;59(5):e02160-20. DOI: 10.1128/JCM.02160-20
27. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson WH, et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Rep Med.* 2020 Jun 23;1(3):100040. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100040
28. Berestovskaya VS, Vavilova TV, Gubanova AV, Chernysh NYu. Key features of tests for detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Medical alphabet.* 2021;(13):13-17 (In Russian).
29. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. *medRxiv [Preprint].* 2020 Apr 24:2020.04.20.20071423. DOI: 10.1101/2020.04.20.20071423. Update in: *J Infect Dis.* 2020 May 19.
30. Van Elslande J, Decru B, Jonckheere S, Van Wijngaerden E, Houben E, Vandecandelaere P, et al. Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by four automated immunoassays and three ELISAs. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Nov;26(11):1557.e1-1557.e7. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.07.038
31. Woo PC, Lau SK, Wong BH, Tsoi HW, Fung AM, Kao RY, et al. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and SARS coronavirus nucleocapsid protein ELISA for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3054-8. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3054-3058.2005
32. Kaufman HW, Chen Z, Meyer WA 3rd, Wohlgenuth JG. Insights from Patterns of SARS-CoV-2 Immunoglobulin G Serology Test Results from a National Clinical Laboratory, United States, March–July 2020. *Popul Health Manag.* 2021 Feb;24(S1):S35-S42. DOI: 10.1089/pop.2020.0256
33. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to eight months after infection. *Science.* 2021 Feb 5;371(6529):eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063
34. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020 Jun 9;323(22):2249-2251. DOI: 10.1001/jama.2020.8259
35. Petersen LR, Sami S, Vuong N, Pathela P, Weiss D, Morgenthau BM, et al. Lack of antibodies to SARS-CoV-2 in a large cohort of previously infected persons. *Clin Infect Dis.* 2021 Nov 2;73(9):e3066-e3073. DOI: 10.1093/cid/ciaa1685
36. Li K, Huang B, Wu M, Zhong A, Li L, Cai Y, et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat Commun.* 2020 Nov 27;11(1):6044. DOI: 10.1038/s41467-020-19943-y
37. Kolupaev VE, Tarasenko OA. Selection criteria for serological tests in laboratory diagnostics of COVID-19. *Vestnik Roszdravnadzora.* 2020;6:53-61. DOI: 10.35576/2070-7940-2020-5-1-73-78

Информация об авторах:

Соловьев Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов 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) 360065
E-mail: solo103@mail.ru

Баранова Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов 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) 36-0065

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии 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) 36-0773
E-mail: ignatov@obolensk.org

Бикетов Сергей Федорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов 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) 36-0065
E-mail: biketov@obolensk.org

Information about authors:

Pavel V. Soloviev, MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 360065
E-mail: solo103@mail.ru

Evgeniya V. Baranova, MD, PhD, Leading Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 360065

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0773
E-mail: ignatov@obolensk.org

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of the Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 360065
E-mail: biketov@obolensk.org

Питательные среды для выявления и культивирования клостридий

Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, И.С.Косилова, М.В.Храмов, А.П.Шепелин

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

В статье приводятся общая характеристика клостридий и особенности бактериологических исследований по их обнаружению в клинических образцах и объектах окружающей среды. Описаны питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ, которые могут быть использованы для выявления, культивирования, определения чувствительности клостридий к антимикробным препаратам. Приведены результаты исследований эффективности этих питательных сред. **Ключевые слова:** *Clostridium*, сульфитредуцирующие клостридии, сульфитный агар, железосульфитный агар, среда Вильсона–Блера, среда Китта–Тароцци, тиогликолевая среда, колумбийский агар, антибиотикочувствительность

Для цитирования: Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Косилова И.С., Храмов М.В., Шепелин А.П. Питательные среды для выявления и культивирования клостридий. Бактериология. 2021; 6(4): 62–69. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-62-69

Nutrient media for detection and cultivation of clostridia

L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, I.S.Kosilova, M.V.Khramov, A.P.Shepelin

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

The article deals with a general characterization of clostridia as well as with specific features of bacteriological assays for their identification in clinical and environmental specimens. Nutrient media produced by FBIS SRCAMB to identify and culture clostridia as well as to determine their antimicrobial susceptibility are described. There are results from the efficiency assessment of the nutrient media.

Key words: *Clostridium*, sulfite-reducing clostridia, sulfite agar, iron sulfite agar, Wilson–Blair medium, Kitt–Tarozzi medium, thioglycollate medium, Columbia agar, antimicrobial susceptibility

For citation: Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Kosilova I.S., Khramov M.V., Shepelin A.P. Nutrient media for detection and cultivation of clostridia. Bacteriology. 2021; 6(4): 62–69. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-62-69

Общая характеристика клостридий

Представители рода *Clostridium* относятся к числу широко распространенных микроорганизмов. Они встречаются повсеместно в окружающей среде: воздухе, почве, воде, разлагающейся растительности, продуктах питания, а также в кишечном тракте людей и животных [1].

Клостридии вызывают три смертельно опасных заболевания – газовую гангрену (*C. perfringens* и другие «гистотоксические» клостридии), столбняк (*C. tetani*) и ботулизм (*C. botulinum*). Кроме того, они причастны к патологии пищеварительного тракта, включая относительно легко протекающие гастроэнтериты и деструктивные процессы, требующие активного лечения (*C. perfringens*, *Clostridioides difficile*). К патогенным видам также относятся *C. chauvoei*,

C. septicum, *C. novyi* типов А и В, *C. haemolyticum*, *C. sordellii*, *C. colinum*, *C. spiroforme* и др. Патогенность клостридий связана со способностью продуцировать мощные токсины, которые образуются в инфицированном организме или во внешней среде.

К санитарно-показательным микроорганизмам относят клостридии, редуцирующие сульфит-ионы на железосульфитном агаре при температуре $44 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч. Эта группа на 90% представлена *C. perfringens*, обитающей в кишечнике большинства людей. Количественный учет клостридий предусмотрен при исследовании потенциальных источников пищевых отравлений – пищевых продуктов (мясных, молочных, рыбных, мяса птицы), почвы, воды открытых водоемов и лечебных грязей.

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 15.07.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemical Sciences), Leading Researcher of the Laboratory of Culture Media of the Laboratory of Culture Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 15.07.2021, accepted for publication 27.12.2021

Выявление спор сульфитредуцирующих клостридий рекомендовано при оценке эффективности технологических процессов очистки воды, поскольку эти споры весьма устойчивы к обеззараживанию хлором и другими дезсредствами. В соответствии с требованиями СанПиН 1.2.3685-21 одним из санитарно-микробиологических показателей безопасности воды систем централизованного питьевого водоснабжения, в том числе горячего водоснабжения, является отсутствие спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 см³ воды.

При анализе пищевых продуктов помимо спор определяют наличие вегетативных клеток сульфитредуцирующих клостридий [2, 3].

Особенности культивирования клостридий

Поскольку клостридии являются анаэробными микроорганизмами, важным условием, которое необходимо соблюдать на всех этапах выделения и идентификации анаэробов, является защита этих микробов от токсического действия молекулярного кислорода. Время между взятием материала и его посевом на питательные среды должно быть максимально коротким, важно не допускать перемешивания образца перед тестированием, чтобы не увеличивать содержание кислорода в нем. Замораживание и размораживание образцов также не рекомендуется, поскольку вегетативные клетки сульфитредуцирующих клостридий плохо переносят эту процедуру. Разведение образцов пищевых продуктов желательно проводить в свежеприготовленных растворах с минимально возможным содержанием кислорода. После посева чашки с агаром следует как можно быстрее поместить в анаэробные условия [4].

Для создания анаэробных условий инкубирования используют анаэростаты с газовой смесью для культивирования анаэробов, которая состоит из 80% азота, 10% водорода и 10% углекислого газа. Такой состав создается либо механически за счет удаления (откачивания) воздуха из анаэростата и последующего заполнения газовой смесью, либо химическим способом при использовании специальных газогенерирующих пакетов. Активация газогенерирующих пакетов происходит при добавлении дистиллированной воды, после чего происходит химическое связывание кислорода. В результате концентрация кислорода в анаэростате снижается, а концентрация углекислого газа возрастает.

Анаэробные бактерии необходимо культивировать только на специальных бескислородных средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (10–150 мВ). Анаэробные условия для роста анаэробов достигаются посевом в питательные среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества, или при глубинном методе посева микроорганизмов в плотные (агаризованные) питательные среды.

В качестве редуцирующих веществ используют кусочки животных тканей (печень, мозг, почки, селезенка), которые связывают растворенный в среде кислород и адсорбируют бактерии. Некоторыми нормативными документами в Российской Федерации для культивирования мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов рекомендована среда Китта–Тароцци – жидкая или полужидкая среда, содержащая в своем составе кусочки печени, мяса или рыбы [3, 5–7]. В МУК 4.2.2316-08 она названа среда Тароцци.

В иностранных источниках питательную среду с кусочками животных тканей называют cooked meat medium [8]. Среда Китта–Тароцци, описанная в разных источниках, может различаться как по составу, так и по способу приготовления.

Для выделения облигатных анаэробов широко используются питательные среды, содержащие такие восстановители, как тиогликолят натрия, цистеина гидрохлорид, сульфит натрия, дитиотреитол и дитионит натрия. Для контроля за степенью насыщения кислородом в состав питательных сред добавляют специальные редокс-индикаторы (метилновый синий, резазурин). Примером питательной среды, содержащей восстановители и индикатор, может служить используемая для проведения испытаний на стерильность тиогликолевая среда, которая обеспечивает рост как аэробных микроорганизмов, так и строгих анаэробов [9, 10].

Для выявления сульфитредуцирующих клостридий предназначена среда, называемая железосульфитный (сульфитный) агар. Впервые использовать способность клостридий восстанавливать сульфит-ионы с образованием нерастворимого сульфида железа черного цвета в качестве индикатора роста предложили Вильсон и Блер в 1924 г. для выделения из воды *C. perfringens* [11]. Разработанную питательную среду авторы назвали iron sulfite agar (железосульфитный агар). Под этим названием среда описывается в англоязычной литературе. В некоторых российских нормативных документах среду называют средой Вильсона–Блера, что зачастую вызывает путаницу, поскольку средой Вильсона–Блера иногда называют висмут-сульфитный агар, разработанный теми же авторами, но содержащий цитрат висмута и бриллиантовый зеленый и предназначенный для выделения сальмонелл.

Состав коммерческого железосульфитного агара отличается от первоначального: хлорид железа сначала был заменен на железоммонийные квасцы (железа (III) аммония сульфат), а затем на цитрат железа. Введение цитрата железа привело к получению более прозрачной среды.

Поскольку, помимо клостридий, и другие бактерии могут образовывать сульфиды, их вегетативные формы должны быть удалены из исследуемых образцов соответствующей обработкой (например, пастеризацией). Иногда для селективного выделения клостридий рекомендовано использование питательных сред, содержащих антибиотики, например триптозо-сульфит-циклосериновый и сульфит-полимиксин-неомициновый агары [5, 12]. Среда с добавлением цикloserина не требует пастеризации, позволяет обнаруживать вегетативные клостридиальные клетки в мясе и мясных продуктах и ингибирует рост *Bacillus* spp.

Для выделения непосредственно *C. perfringens* из фекалий человека и животных предложены несколько питательных сред, но ни одна из них не является идеальной [13]. На колумбийском агаре с бараньей кровью колонии *C. perfringens* образуют двойные зоны гемолиза: узкую зону полного гемолиза внутри большой зоны частичного гемолиза. Рост других гемолитических бактерий, таких как *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., некоторые штаммы *E. coli* и *C. bifermentans*, может препятствовать правильной идентификации *C. perfringens*. Добавление яичного желтка в чашки с агаром приводит к образованию непрозрачных зон вокруг колоний *C. perfringens*, что связано с его лецитиназной активностью. Однако *C. sordelli* и *C. bifermentans* продуцируют

ферменты, которые тесно связаны с альфа-токсином *C. perfringens* (лецитиназой), и поэтому могут давать ложноположительные результаты. Из сульфит-содержащих питательных сред для выделения *C. perfringens* используют среды с добавлением циклосерина или канамицина и полимиксина.

Недавно разработан новый хромогенный агар для селективного выделения *C. perfringens* (CHROMagar *C. perfringens*). На нем *C. perfringens* формирует оранжевые колонии, а другие микроорганизмы либо не растут, либо образуют колонии сине-зеленого цвета. Сравнительные исследования четырех питательных сред (кровяного колумбийского агара; Perfringens Agar Base, обогащенного 5% стерильной яичной эмульсии, 12 мг/л канамицина сульфата и 30 000 МЕ/л полимиксина В; триптозо-сульфитного агара с добавкой 400 мг/л D-циклосерина и CHROMagar *C. perfringens*) продемонстрировали их одинаковую чувствительность [13]. Но по специфичности хромогенный агар превосходил остальные три среды.

Определение чувствительности клостридий к антимикробным препаратам

Актуальной проблемой современного здравоохранения является распространение устойчивых к антимикробным препаратам (АМП) микроорганизмов, особенно аэробных. Среди анаэробных бактерий повышенной резистентностью ко многим классам антибиотиков отличаются *C. difficile*, вызывающая антибиотикоассоциированную диарею, и клостридии, относящиеся к RIC-группе (*C. ramosum*, *C. innocuum*, *C. clostridioforme*) [14]. Данные о чувствительности к антибиотикам штаммов *C. perfringens* и других видов клостридий, вызывающих газовую гангрену, весьма ограничены. В некоторых публикациях отмечается появление штаммов *C. perfringens*, устойчивых к препарату первого выбора – пенициллину, а также к имипенему, метронидазолу, цефтриаксону, клиндамицину, хлорамфениколу, пенициллину, ванкомицину, бацитрацину и др. [15, 16].

Анализ публикаций показал нестандартность подхода к определению антибиотикоустойчивости представителей рода *Clostridium*. Некоторые авторы использовали диско-диффузионный метод [17], другие – метод микроразведений в бульоне [18] или метод градиентной диффузии [15, 16, 19]. Различия в подходах касаются и используемых питательных сред. Описано применение кровяного колумбийского агара [20], агара и бульона для бруцелл со специальными добавками [16], агара Мюллера–Хинтона с добавками [15].

Ведущими организациями по стандартизации – CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов) и EUCAST (Европейский комитет по определению антимикробной чувствительности) – для определения чувствительности анаэробных бактерий в настоящее время рекомендованы только методы определения минимальной подавляющей концентрации (МПК). CLSI рекомендует проводить тестирование МПК методом микроразведений в бульоне, для которого используют бульон для бруцелл с добавлением 5 мг/л гемаина, 1 мг/л витамина K1 и 5% лошадиной крови; и методом разведений в агаре (референтный метод) на агаре для бруцелл с добавлением 5 мг/л гемаина, 1 мг/л витамина K1 и 5% бараньей крови [21].

EUCAST для определения чувствительности микроорганизмов со сложными питательными потребностями рекомендует использовать агар или бульон Мюллера–Хинтона с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л никотинамидадениндинуклеотида (-NAD), но для грамположительных анаэробных бактерий методики определения чувствительности окончательно не стандартизованы.

Коммерческие питательные среды для выявления и культивирования клостридий

Зарубежные фирмы-производители выпускают ряд коммерческих питательных сред для выявления и культивирования клостридий. Среди них можно выделить анаэробный агар (anaerobic agar), готовую мясную среду (cooked meat medium), железосульфитный агар (iron sulfite agar), усиленную среду для клостридий (reinforced clostridial medium), триптозный агар с сульфитом и циклосерином (TSC), тиогликолевую среду (thioglycollate medium), агар Шедлера (Schaedler agar).

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработаны технологии производства и осуществляется промышленный выпуск следующих питательных сред, которые могут быть использованы для выделения и культивирования клостридий:

- питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях (среда Вильсона–Блера);
- питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях (железосульфитный агар);
- питательная среда для выявления клостридий по сульфитредуцирующему признаку сухая (сульфитный агар);
- питательная среда для культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов сухая (среда Китта–Тароцци);
- питательная среда для контроля стерильности сухая (тиогликолевая среда);
- питательная среда для контроля стерильности сухая (тиогликолевая среда с резазурином);
- питательная среда для бактериологических исследований колумбийский агар сухой;
- питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая (агар Мюллера–Хинтона II);
- питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллеза сухой (бруцеллагар).

Среда Вильсона–Блера и железосульфитный агар предназначены для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов, воды, почвы с целью выявления сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях. **Сульфитный агар** предназначен для бактериологических исследований не только в санитарной, но и в клинической микробиологии с целью выявления сульфитредуцирующих клостридий при микробиологической диагностике дисбактериоза кишечника. Эта среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05626).

Необходимость в выпуске идентичных сред различного наименования обусловлена отсутствием единообразия в нормативных документах. Нормативными документами

(ISO, ГОСТы) для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, включая *C. perfringens*, в пищевых продуктах, воде, почве и др. регламентировано, как правило, использование железосульфитного агара [2]. Тем не менее некоторые стандарты рекомендуют для тех же целей среду Вильсона–Блера [3, 6, 12].

Все три описанные питательные среды имеют сходный компонентный состав, который обеспечивает необходимые для роста и дифференциации сульфитредуцирующих клостридий вещества. Входящий в их состав гидролизат казеина является источником углерода, азота, минералов; дрожжевой экстракт – источником витаминов группы В, которые стимулируют рост бактерий. Железа цитрат и натрия сульфит являются индикаторами продукции сероводорода – кло-

стридии восстанавливают сульфит-ионы до сульфид-ионов, которые вступают в реакцию с ионами железа, образуя черный осадок сульфида железа.

Сульфитный и железосульфитный агар выпускаются в трех модификациях, различающихся концентрацией агара: модификация 1 (1,5 г/л агара), модификация 2 (7,0 г/л агара) и модификация 3 (17,5 г/л агара), и могут быть использованы как в пробирках (модификации 1 и 2), так и в чашках Петри (модификация 3). Среда Вильсона–Блера не имеет модификаций и содержит агар в концентрации 11,0 г/л (рис. 1). По биологическим показателям качества среда Вильсона–Блера, сульфитный и железосульфитный агар не отличаются между собой.

В ходе проведения клинических испытаний сульфитного агара во ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области» и в испытательном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН установлено, что испытываемая питательная среда обладает более высокой чувствительностью по сравнению с контрольной средой, в качестве которой использована среда Вильсона–Блера лабораторного приготовления.

В Центре гигиены и эпидемиологии был проведен анализ 115 проб фекалий с использованием сульфитного агара модификации 2 и 50 проб с использованием сульфитного агара модификации 1. В первом случае сульфитредуцирующие клостридии обнаружены в 52 пробах, а во втором – в 20 пробах. В то же время на контрольной среде положительных результатов было 49 и 19 соответственно.

При исследовании 110 образцов консервов и специй во ВНИИ МП сульфитредуцирующие клостридии выявлены в 15 образцах на каждой из трех модификаций сульфитного агара, а на контрольной среде – только в 10 образцах.

Среда Китта–Тароцци предназначена для бактериологических исследований в санитарной микробиологии с целью выявления облигатно-анаэробных микроорганизмов в пищевых продуктах, пищевом сырье, кормах для животных, объектах окружающей среды, а также для восстановления анаэробных микроорганизмов из лиофилизированного состояния или со среды хранения.

Среда Китта–Тароцци представляет собой набор, состоящий из сухой основы питательной среды (далее – Основа) – 1 банка, и печени говяжьей сухой – 4 пакета (на 100 г Основы) или 5 пакетов (на 125 г Основы). Совокупность компонентов, входящих в состав Основы, обеспечивает рост широкого спектра микроорганизмов, в том числе облигатно-анаэробных. Вязкость питательной среды защищает от быстрого проникновения в нее кислорода. Печень говяжья является редуцирующим кислород компонентом, который обеспечивает анаэробнозис, достаточный для строгих анаэробов.

Среда Китта–Тароцци обеспечивает рост таких строгих анаэробов, как *C. perfringens* и *C. novyi*, через 18–24 ч инкубации (рис. 2).

При разработке технологии производства среды Китта–Тароцци в качестве прототипа была выбрана среда Тароцци лабораторного приготовления на основе перевара Хоттингера по МУК 4.2.2316-08. В результате проведенных исследований полученная среда Китта–Тароцци превосходила прототип по показателям скорости роста и эффектив-

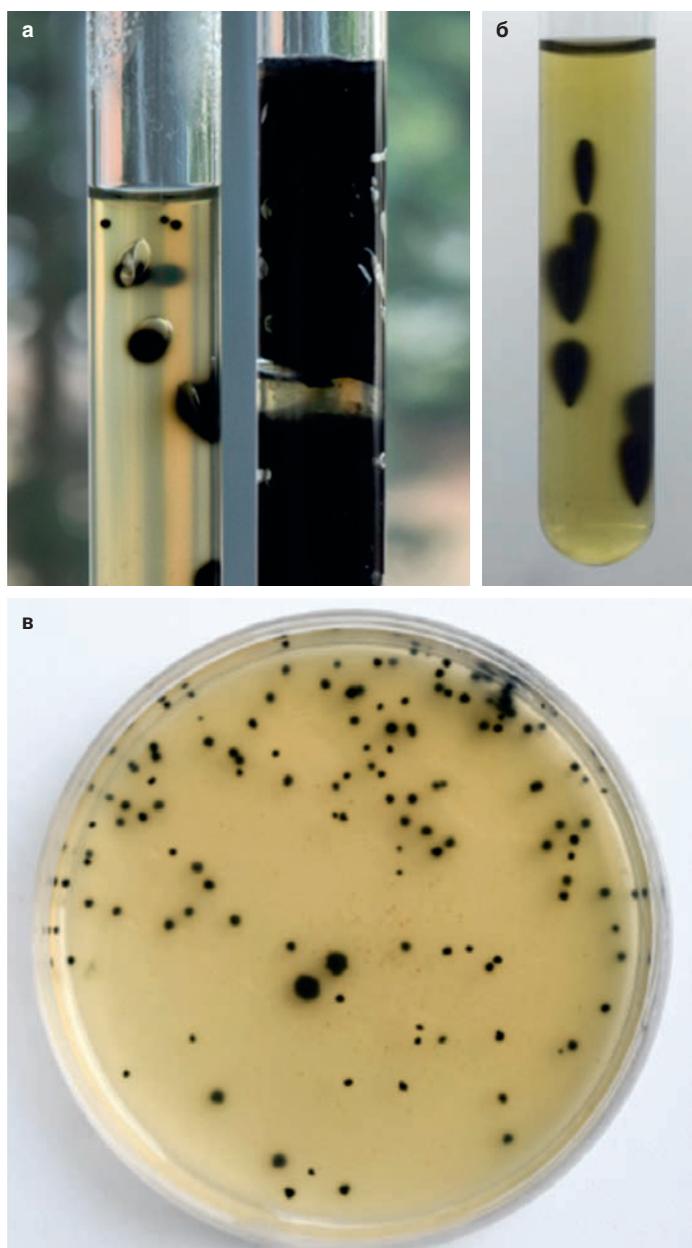


Рис. 1. Рост *C. perfringens* через 18 ч инкубирования:
а) *C. perfringens* ATCC 13124 на среде Вильсона–Блера;
б) *C. perfringens* ATCC 10543 на железосульфитном агаре модификации 1;
в) *C. perfringens* ATCC 13124 на железосульфитном агаре модификации 3 (глубинный посев).

ности среды. В частности, через 18 ч инкубирования выход микробных клеток *C. perfringens* ATCC 13124 с 1 мл среды Китта–Тароцци был выше на 43%, *C. novyi* 198 – на 37%, а *C. sporogenes* ATCC 19404 – на 29%, чем со среды Тароцци лабораторного приготовления.

Тиогликолевая среда – универсальная питательная среда для выращивания широкого спектра анаэробных и аэробных микроорганизмов. В нашем Центре осуществляется выпуск двух вариантов тиогликолевой среды. Первый – тиогликолевая среда по ТУ 9398-040-78095326-2008, она зарегистрирована в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03235) и предназначена для бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии с целью контроля стерильности лекарственных средств, медицинских иммунологических препаратов. Второй вариант – это тиогликолевая среда с резазурином по ТУ 20.59.52-328-78095326-2020, она не является медицинским изделием и предназначена для проведения испытаний на стерильность различных лекарственных средств и парфюмерно-косметической продукции, для которых установлены требования стерильности.

Оба варианта тиогликолевой среды содержат редуцирующие компоненты – натрия тиогликолят и цистеина гидрохлорид, которые обеспечивают уровень окислительно-восстановительного потенциала, достаточный для строгих анаэробов, а вязкость питательной среды защищает от быстрого проникновения кислорода. Тиогликолят натрия является инактиватором ртутных соединений, поэтому питательная среда может быть использована при исследовании образцов, содержащих ртутные консерванты. В состав тиогликолевой среды с резазурином дополнительно входит окислительно-восстановительный индикатор резазурин, который



Рис. 2. Рост *C. perfringens* ATCC 13124 (слева) и *C. novyi* 198 (справа) через 18 ч инкубирования на среде Китта–Тароцци.



Рис. 3. Рост *C. perfringens* ATCC 13124 через 18 ч инкубирования на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови.

позволяет визуально оценить насыщенность среды кислородом по изменению ее цвета со светло-желтого на красный.

В соответствии с требованиями ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность» (ГФ РФ XIV изд.) контроль качества тиогликолевой среды по биологическим показателям необходимо осуществлять с использованием семи тест-штаммов: *Alcaligenes faecalis* 415, *C. novyi* 198, *C. sporogenes* ATCC 19404, *Bacillus subtilis* 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* NCTC 885-653. В ФБУН ГНЦ ПМБ с использованием этих семи тест-штаммов проведены сравнительные испытания обоих вариантов тиогликолевой среды собственного производства и трех аналогичных питательных сред иностранных производителей: Thioglycolate Medium G (Merck, кат. №1.16761.0500), Difco Fluid Thioglycollate Medium (Becton Dickinson, кат. №225650) и Thioglycollate Fluid Medium European Pharmacopoeia, USP (Pronadisa, кат. №905091). Через 48 ч инкубирования на всех исследованных средах характер роста шести штаммов (*A. faecalis* 415, *C. sporogenes* ATCC 19404, *B. subtilis* 6633, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538 и *C. albicans* NCTC 885-653) не отличался между собой и соответствовал требованиям ОФС 1.2.4.0003.15. В то же время штамм *C. novyi* 198 вырос при посеве бактериальной суспензии из разведений 10^{-4} и 10^{-5} только на тиогликолевых средах отечественного производства, а на исследованных иностранных питательных средах рост отсутствовал.

Колумбийский агар – высокопитательная среда общего назначения, используемая для выделения и культивирования широкого спектра микроорганизмов из клинических и неклинических образцов. Для выделения и культивирования требовательных микроорганизмов в среду добавляют от 5 до 10% дефибринированной крови животных, наиболее часто – дефибринированную баранью кровь. Колумбийский агар рекомендован Фармакопеей США (USP), Европейской

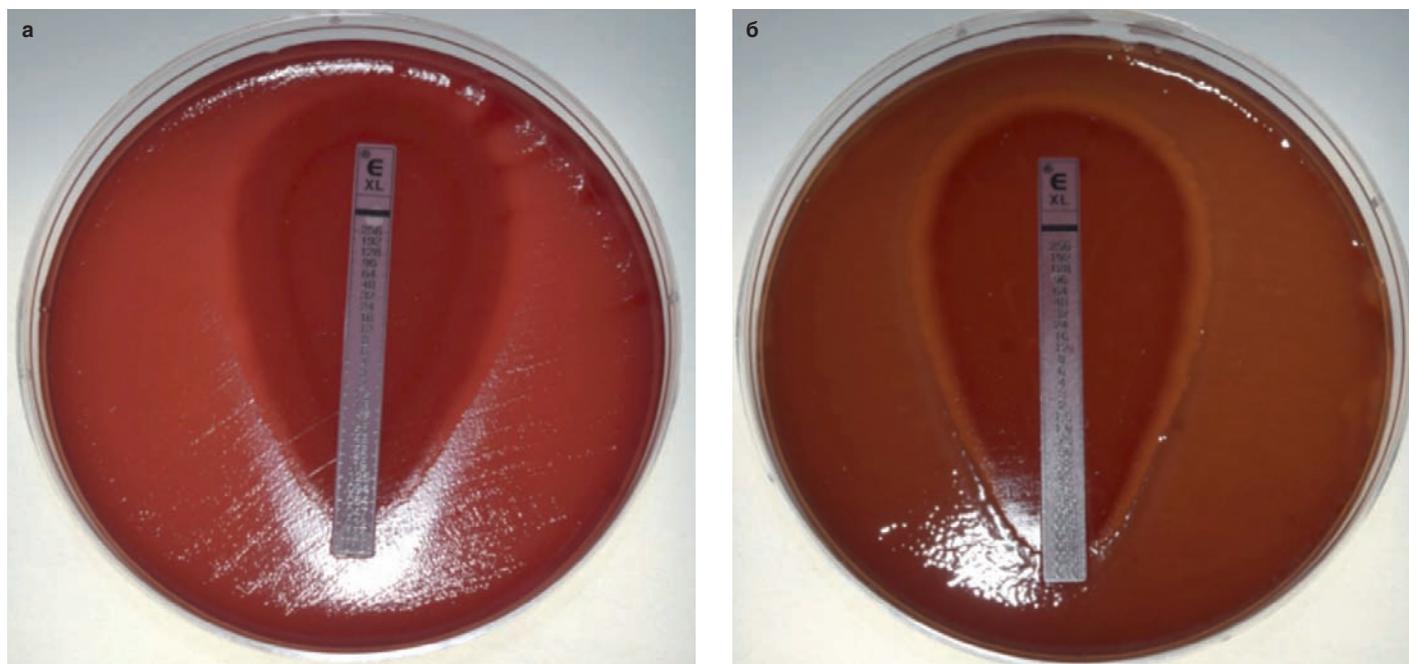


Рис. 4. Результаты определения значений МПК амоксициллина/клавулановой кислоты для *C. perfringens* ATCC 13124 через 18 ч инкубации при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$:

- а) на агаре Мюллера–Хинтон II с добавлением лошадиной крови и β -NAD;
 б) на бруцеллагаре с добавлением гемина, витамина K1 и бараньей крови.

фармакопеей (EU) и Японской фармакопеей (JP) для испытаний нестерильной продукции на наличие клостридий.

Колумбийский агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ зарегистрирован в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03235). Кровяной агар, приготовленный на основе этой среды, обеспечивает в анаэробных условиях рост клостридий, включая *C. perfringens*. При культивировании *C. perfringens* формируются типичные колонии с характерными двойными зонами гемолиза (рис. 3).

Питательные среды для определения чувствительности к antimicrobial препаратам

Агар Мюллера–Хинтон II предназначен для определения чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом и может быть использован для определения МПК методом градиентной диффузии с помощью E-тестов. Бруцеллагар предназначен для культивирования и выделения бруцелл из клинического материала и пищевых продуктов животного происхождения при их бактериологическом исследовании.

В ходе лабораторных исследований показана принципиальная возможность использования обеих питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (агара Мюллера–Хинтон II и бруцеллагара) при определении МПК для двух тест-штаммов: *C. perfringens* ATCC 13124 и *C. sporogenes* ATCC 19404. Значения МПК трех АМП сравнивали с результатами, полученными на аналогичных питательных средах иностранного производства: Mueller Hinton II Agar (BD BBL, кат. №211438) и Brucella Agar (BD BBL, кат. №211086). Для тестирования в оба агара Мюллера–Хинтон II добавляли 5% лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD, а в оба бруцеллагара – 5 мг/л гемина, 1 мг/л витамина K₁ и 5% бараньей крови.

Как показали результаты, значения МПК исследованных антибиотиков в отношении проанализированных штаммов были идентичны на всех используемых питательных средах (рис. 4). Так, значение МПК амоксициллина/клавулановой кислоты составляло 0,032 мг/л, ампициллина/сульбактама – 0,023 мг/л, а меропенема – 0,023 мг/л для *C. perfringens* ATCC 13124. Значение МПК амоксициллина/клавулановой кислоты составляло 0,094 мг/л, ампициллина/сульбактама – 0,064 мг/л, а меропенема – 0,047 мг/л для *C. sporogenes* ATCC.

Проведенные нами исследования и анализ публикаций, посвященных определению чувствительности клостридий к АМП [14–20], показывают необходимость дальнейшего исследования и стандартизации методики определения антибиотикочувствительности клостридий.

Заключение

Клостридии широко распространены в окружающей среде и представляют собой довольно разнородную группу. Количественному учету при исследовании потенциальных источников пищевых отравлений – пищевых продуктов, почвы, воды открытых водоемов и лечебных грязей – подлежат сульфитредуцирующие клостридии, относящиеся к санитарно-показательным микроорганизмам. В соответствии с требованиями нормативных документов для их выявления и подсчета используются питательные среды. Большинство питательных сред содержат соль сернистой кислоты (сульфит) и растворимую соль железа, что позволяет выявлять клостридии по способности восстанавливать сульфиты. К числу таких питательных сред относятся среда Вильсона–Блера, железосульфитный и сульфитный агар. Выбор других питательных сред (среда Китта–Тароцци, колумбийский агар, тиогликолевая среда) зависит от цели и задач исследования.

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

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Выражаем огромную благодарность за оказанную помощь при проведении клинических испытаний сульфитного агара сотрудникам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области» и испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН, особенно к.т.н. Юлии Константиновне Юшиной.

Gratitude

The authors express their deep gratitude for the assistance in conducting clinical trials of sulfite agar to the staff of the FBUZ "Center for Hygiene and Epidemiology in the Kaluga Region" and the testing center of the FGBNU "FSC Food Systems named after VM Gorbатов" of the Russian Academy of Sciences, especially Yulia K. Yushina, Ph.D.

Литература

1. Лобзин ЮВ, Кветная АС, Скрипченко НВ, Железова ЛИ. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021;98(1):91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37
2. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях: ГОСТ 29185-2014 (ISO 15213:2003). М.: Стандартинформ; 2015.
3. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий: ГОСТ 7702.2.6-2015. М.: Стандартинформ; 2016.
4. Clostridia in medical, veterinary and food microbiology – Diagnosis and typing. Ed.-in-chief Mainil J. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2006.
5. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе: ГОСТ 10444.1-84. М.: Стандартинформ; 2010.
6. Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям: ГОСТ 7702.2.0-2016. М.: Стандартинформ; 2016.
7. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
8. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4th ed. CRC press; 2010.
9. Clinical veterinary microbiology. Ed. by Markey B. 2nd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
10. Curtis GDW, Baird RM, Corry JEL (ed.). Handbook of culture media for food and water microbiology. 3rd ed. Royal Society of Chemistry; 2011.

11. Wilson WJ, Blair EMMV. The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. The Journal of Pathology and Bacteriology. 1924;27(1):119-121.
12. Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*: ГОСТ 10444.9-88. М.: Стандартинформ; 2010.
13. Hustá M, Ducatelle R, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Goossens E. A comparative study on the use of selective media for the enumeration of *Clostridium perfringens* in poultry faeces. Anaerobe. 2020 Jun;63:102205. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102205
14. Шильникова ИИ, Дьякова СА, Кулага ЕВ, Соколова ЕН, Терещенко ИВ, Дмитриева НВ. Идентификация и чувствительность к антибиотикам клостридий, включая *Clostridium difficile*, выделенных при инфекционных осложнениях у онкологических больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(7):439-444. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-439-444
15. Akhi MT, Bidar Asl S, Pirzadeh T, Naghili B, Yeganeh F, Memar Y, Mohammadzadeh Y. Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015 Jul 25;8(7):e20863. DOI: 10.5812/jjm.20863v2
16. Fourie JJC, Bezuidenhout CC, Sanko TJ, Mienie C, Adeleke R. Inside environmental *Clostridium perfringens* genomes: antibiotic resistance genes, virulence factors and genomic features. J Water Health. 2020 Aug;18(4):477-493. DOI: 10.2166/wh.2020.029
17. Khanna N. Clindamycin-resistant *Clostridium perfringens* cellulitis. J Tissue Viability. 2008 Aug;17(3):95-7. DOI: 10.1016/j.jtv.2008.04.001
18. Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, Rupnik M, Ocepek M. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. J Med Microbiol. 2013 Sep;62(Pt 9):1478-1485. DOI: 10.1099/jmm.0.058875-0
19. Tansuphasiri U, Matra W, Sangsuk L. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005 Jul;36(4):954-61.
20. Poilane I, Cruaud P, Rousseau JG, Torlotin JC, Collignon A. Sensibilité de *Clostridium difficile* au métronidazole par le E-test: influence du milieu de culture [Susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole using the E-test: effect of the culture medium]. Pathol Biol (Paris). 1999 May;47(5):515-8.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 6th ed. M11-A7. CLSI, Wayne, PA.

References

1. Lobzin YuV, Kvetnaya AS, Skripchenko NV, Zhelezova LI. Current notions about etiopathogenic and genetics specific features of *Clostridium perfringens* toxins. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2021;98(1):91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37 (In Russian).
2. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Methods for detection and enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions: GOST 29185-2014 (ISO 15213:2003). Moscow: Standartinform; 2015. (In Russian).
3. Poultry meat, edible offal and ready-to-cook products. Methods for detection and quantity determination of sulfite-reducing clostridium: GOST 7702.2.6-2015. Moscow: Standartinform; 2016. (In Russian).
4. Clostridia in medical, veterinary and food microbiology – Diagnosis and typing. Ed.-in-chief Mainil J. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2006.
5. Canned food. Preparation of reagent solutions, dyes, indicators and culture media for microbiological analysis: GOST 10444.1-84. Moscow: Standartinform; 2010. (In Russian).
6. Poultry slaughtering products, poultry meat ready-to-cook products and the objects of production environment. Sampling methods and the preparation to

- microbiological analyses: GOST 7702.2.0-2016. Moscow: Standartinform; 2016. (In Russian).
7. Methods of control of bacteriological nutrient media: methodical instructions MUK 4.2.2316–08. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2008. (In Russian).
 8. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4th ed. CRC press; 2010.
 9. Clinical veterinary microbiology. Ed. by Markey B. 2nd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
 10. Curtis GDW, Baird RM, Corry JEL. (ed.). Handbook of culture media for food and water microbiology. 3rd ed. Royal Society of Chemistry; 2011.
 11. Wilson WJ, Blair EMMV. The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. The Journal of Pathology and Bacteriology. 1924;27(1):119-121.
 12. Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*: ГОСТ 10444.9-88. М.: Стандартинформ; 2010.
 13. Hustá M, Ducatelle R, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Goossens E. A comparative study on the use of selective media for the enumeration of *Clostridium perfringens* in poultry faeces. Anaerobe. 2020 Jun;63:102205. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102205
 14. Shilnikova II, Dyakova SA, Kulaga EV, Sokolova EN, Tereschenko IV, Dmitrieva NV. The Identification and sensitivity to antibiotics of clostridia, including *Clostridia difficile* isolated under infectious complications in oncologic patients. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(7):439-444. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-439-444
 15. Akhi MT, Bidar Asl S, Pirzadeh T, Naghili B, Yeganeh F, Memar Y, Mohammadzadeh Y. Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015 Jul 25;8(7):e20863. DOI: 10.5812/jjm.20863v2
 16. Fourie JGJ, Bezuidenhout CC, Sanko TJ, Mienie C, Adeleke R. Inside environmental *Clostridium perfringens* genomes: antibiotic resistance genes, virulence factors and genomic features. J Water Health. 2020 Aug;18(4):477-493. DOI: 10.2166/wh.2020.029
 17. Khanna N. Clindamycin-resistant *Clostridium perfringens* cellulitis. J Tissue Viability. 2008 Aug;17(3):95-7. DOI: 10.1016/j.jtv.2008.04.001
 18. Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, Rupnik M, Oceppek M. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. J Med Microbiol. 2013 Sep;62(Pt 9):1478-1485. DOI: 10.1099/jmm.0.058875-0
 19. Tansuphasiri U, Matra W, Sangsuk L. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005 Jul;36(4):954-61.
 20. Poilane I, Cruaud P, Rousseau JG, Torlotin JC, Collignon A. Sensibilité de *Clostridium difficile* au métronidazole par le E-test: influence du milieu de culture [Susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole using the E-test: effect of the culture medium]. Pathol Biol (Paris). 1999 May;47(5):515-8.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 6th ed. M11-A7. CLSI, Wayne, PA.

Информация об авторах:

Подкопаев Ярослав Васильевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: podkopaev@obolensk.org

Косилова Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0079
 E-mail: khramov@obolensk.org

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

Information about authors:

Yaroslav V. Podkopaev, PhD (Biological Sciences), Researcher of the Laboratory of Culture Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: podkopaev@obolensk.org

Irina S. Kosilova, Junior Researcher of the Laboratory of Culture Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0079
 E-mail: khramov@obolensk.org

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0020
 E-mail: shepelin@obolensk.org

К вопросу об определении вирулентности штаммов чумного микроба *in vitro*

Т.П.Шмелькова, Е.В.Сазанова, Т.А.Малюкова

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

Проведен анализ подходов к оценке вирулентности возбудителя чумы *in vitro*. Выделены следующие группы методов: молекулярно-генетический, культурально-биохимический, физиологический и иммунологический. Молекулярно-генетический метод регламентирован для исследования полевого материала. Наличие генетических маркеров патогенности возбудителя – первостепенная составляющая вирулентности, анализ экспрессии этих генов – следующий важный шаг на пути дифференциации штаммов по данному показателю. В качестве дополнения к молекулярно-генетическим методам оценки вирулентности актуален поиск информативных показателей вирулентности – биохимических, иммунологических, культуральных, физиологических, которыми обладают вирулентные штаммы возбудителя чумы в условиях максимального проявления своих патогенных свойств. Результаты, полученные при использовании современных подходов к оценке вирулентности чумного микроба *in vitro*, необходимо сопоставлять с показателем ЛД₅₀ как легитимным критерием оценки вирулентности для каждого изучаемого штамма чумного микроба.

Ключевые слова: чума, *Yersinia pestis*, патогенность, вирулентность, *in vitro*

Для цитирования: Шмелькова Т.П., Сазанова Е.В., Малюкова Т.А. К вопросу об определении вирулентности штаммов чумного микроба *in vitro*. Бактериология. 2021; 6(4): 70–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-70-78

Concerning determination of virulent properties of plague microbe *in vitro*

T.P.Shmelkova, E.V.Sazanova, T.A.Malyukova

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

Approaches to the assessment of virulence of plague agent *in vitro* were analyzed. The following groups of methods were outlined: molecular-genetic, cultural-biochemical, physiological and immunological. Molecular-genetic method has been included into nomenclature of studies of field material. Presence of genetic pathogenicity markers of the agent is a paramount component of virulence. Analysis of expression of these genes – is another important step towards differentiation of the strains by the indicator. As a supplement to molecular-genetic methods of virulence assessment, search for informative indicators of virulence – biochemical, immunological, cultural, physiological ones which virulent plague agent strains possess under conditions of maximum manifestation of their pathogenic properties. Results obtained in the course of practicing modern approaches to the assessment of plague microbe virulence *in vitro* should be balanced against LD₅₀ values for every plague microbe strain under investigation as legitimate criteria for virulence to date.

Key words: plague, *Yersinia pestis*, pathogenicity, virulence, *in vitro*

For citation: Shmelkova T.P., Sazanova E.V., Malyukova T.A. Concerning determination of virulent properties of plague microbe *in vitro*. Bacteriology. 2021; 6(4): 70–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-70-78

Патогенность как способность определенного вида/подвида микроорганизмов вызывать заболевание у определенных видов животных (включая человека) и/или растений – краеугольный камень, определяющий интерес исследователей к данному микробу. Вирулентность, как мера патогенности, является количественным показателем, значение которого зависит от конкретного штамма и даже клона патогена, условий его культивирования (пассивации), внутривидовой группы (популяции или клона) организма-хозяина и особенностей его содержания (питания, освещения, влажности и т.д.), а также способа заражения, циркадных ритмов, эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов как патогена, так и хозяина и т.д.

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* отнесен к наиболее опасной I группе патогенности [1]. Оценка вирулентности штаммов возбудителя чумы регламентирована МУ

Для корреспонденции:

Шмелькова Татьяна Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 02.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Tatyana P. Shmelkova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 02.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

3.1.3.2355-08, МУК 4.2.2940-11 при определении номенклатуры и объема исследований для Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности, Референс-центра по мониторингу за чумой и другими особо опасными бактериальными инфекциями, Центров верификации диагностической деятельности, осуществляющих функции государственных коллекций возбудителей особо опасных бактериальных инфекций I–II групп патогенности. Показатель вирулентности штаммов *Y. pestis* используют для паспортизации природных очагов чумы и количественной оценки их эпидемического потенциала в соответствии с «Программой расчета величины эпидемического потенциала природного очага чумы» [2].

С 1940-х гг. лабораторная диагностика чумы включала методы выявления авирулентных штаммов чумного микроба *in vitro* по фенотипическим свойствам: способности к росту при недостатке в среде культивирования ионов кальция при температуре 37°C; неспособности сорбировать из среды культивирования гемин или конго красный (конгорот) [3–6]. В 1969 г. Апариным Г.П. впервые было предложено дифференцировать штаммы *Y. pestis* на высоковирулентные, вирулентные, слабо вирулентные и авирулентные на основании показателя летальной дозы ЛД₅₀ [7]. Показатель ЛД₅₀ для белых мышей является золотым стандартом оценки вирулентности чумного микроба. Для высоковирулентных штаммов ЛД₅₀ при подкожном заражении белых мышей составляет 5–10 м.к. (микробных клеток), слабовирулентных – >1 × 10⁵ м.к., авирулентные – >1 × 10⁶ м.к. [8]. В качестве лабораторных животных также используют морских свинок. Вследствие избирательного характера вирулентности штаммы чумного микроба кавказского (*Y. pestis* subsp. *caucasica*) и алтайского (*Y. pestis* subsp. *altaica*) подвидов природных очагов полевого и пищевочного типов вирулентны для мышей и авирулентны для морских свинок [2].

В дальнейшем алгоритм лабораторной диагностики пополнился молекулярно-генетическими методами, позволяющими исследовать наличие генетических маркеров факторов патогенности.

В настоящее время вирулентность возбудителя чумы регламентировано оценивать как *in vivo*, так и *in vitro* [2]. Однако если при работе с лабораторными животными четко определены последовательность действий и система подсчета результатов, то технологии методов *in vitro* разнородны и постоянно эволюционируют. Вместе с тем способы оценки вирулентных свойств чумного микроба согласуются с концепцией «Три R» – усовершенствования, уменьшения и замены (Refinement, Reduction, Replacement) [9, 10], предусматривающей переход к технологиям без использования лабораторных животных или их лимитирования.

Цель обзора – обозначить спектр подходов к определению вирулентности возбудителя чумы в системе *in vitro*.

Можно выделить следующие группы методов оценки вирулентности чумного микроба *in vitro*: молекулярно-генетические, культурально-биохимические, физиологические, иммунологические.

Патогенность чумного микроба – полидетерминантный признак, который контролируется набором генов хромосомной и плазмидной локализации.

Молекулярно-генетический метод оценки вирулентности чумного микроба вошел в номенклатуру исследований полевого материала [2]. На хромосоме *Y. pestis* расположена область детерминант пигментации (*pgm*-область), в состав которой входят *hms*-локус с генами белков аккумуляции гемина и остров высокой патогенности HPI с генами утилизации железа. Гены таких детерминант патогенности, как белок LcrV (V-антиген) и Yop-белки, локализованы на плазмиде pCad. Потеря этих генов приводит к утрате вирулентности возбудителя чумы для лабораторных животных. Дифференциацию авирулентных и потенциально вирулентных штаммов *Y. pestis* проводят по выявлению генов *irp2* (остров патогенности хромосомной области пигментации), *hmsH* (*hms*-локус хромосомной области пигментации), *IcrV* (плазмиды pCad) с использованием коммерческих наборов реагентов [8, 11, 12].

Культуры одного и того же штамма *Y. pestis* при полном генетическом сходстве могут отличаться по своим вирулентным свойствам. Различия в вирулентности связаны с изменением экспрессии отдельных генов, в частности гена *psaA*, который входит в состав оперона, кодирующего рН6-антиген с антифагоцитарной и адгезивной активностью, и гена *pst*, расположенного на плазмиде pPst, кодирующего синтез пестицина [13].

С помощью современных методов генетического анализа, таких как полногеномное секвенирование, точечный мутагенез, определение экспрессии генов *in vivo*, протеомный и транскриптомный анализ экспрессии генов, обнаружены гены, утрата которых также приводит к снижению вирулентности чумного микроба [14]. Это не только гены, кодирующие изученные и неизученные факторы вирулентности, но и гены, кодирующие регуляторные молекулы, которые осуществляют контроль экспрессии генов *Y. pestis* на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях [15, 16]. Один из регуляторных белков – рецептор циклического аденозинмонофосфата (Cyclic AMP receptor protein/CRP) – регулирует экспрессию многих генов, ассоциированных с вирулентностью – *pla* и системы секреции III типа Yop-YSC *Y. pestis* [17, 18].

Культурально-биохимические методы. Признак пигментации *Y. pestis*, ассоциированный с вирулентностью и связанный с расположенным в *pgm*-области островом высокой патогенности, определяют по способности возбудителя чумы образовывать пигментированные колонии на специальных средах, таких как синтетическая среда с гемом Джексона–Берроуза, агар Хоттингера с 0,05 мкг/мл красителя Конго красного, среда HmsD [19]. Однако среда Джексона–Берроуза практически не используется в настоящее время в связи со сложностями ее приготовления. Для детекции признака пигментсорбции чумного микроба рекомендована цветная дифференциально-диагностическая полусинтетическая среда HmsD [8].

Потребность в ионах кальция является одним из факторов вирулентности возбудителя чумы и служит признаком наличия и функционирования генов плазмиды вирулентности pCad. На среде Хигучи–Смита (магниево-оксалатный агар) авирулентные клетки *Y. pestis* через 40–42 ч инкубации при температуре 37°C образуют колонии I порядка, независимые от ионов кальция (авирулентные), еще через

40 ч дополнительной инкубации при той же температуре клетки с остаточной вирулентностью и тенденцией потери зависимости от ионов кальция дают начало колониям II порядка. Заключительный этап постановки теста – инкубация исходных посевов в течение 30 ч при температуре 28°C с развитием колоний III порядка из вирулентных клеток чумного микроба. Для дифференциации авирулентных (кальций-независимых) и вирулентных (кальцийзависимых) штаммов *Y. pestis* также используют коммерческую питательную среду для определения потребности чумного микроба в ионах кальция производства ФКУЗ Иркутского НИПЧИ [19].

Физиологические методы. Основное отличие авирулентных штаммов от вирулентных – способность распространяться и безудержно размножаться в организме [20]. Проведенный нами ранее анализ неоднородности бактерий по содержанию ДНК на клетку выявил различия в динамике деления вирулентных и авирулентных клеток возбудителя чумы [21]. Культуры вирулентных штаммов возбудителя чумы характеризовались более быстрым (до 48 ч) выходом из состояния репликации ДНК в стационарную фазу (быстрый рост) в отличие от культур авирулентных штаммов (медленный рост, выход в стационарную фазу превышал срок наблюдения – 48 ч). Одно из возможных объяснений зависимости вирулентности культуры от скорости ее размножения – выделение свободной формы липополисахарида (ЛПС) при делении бактерий [22]. Следовательно, чем выше интенсивность размножения бактериальной культуры, тем больше ЛПС высвобождается и более «токсичной» (вирулентной) является культура, так как «основа патогенеза чумы – это действие ЛПС на полиморфноядерные лейкоциты» [23, 24]. Для объективности оценки динамики деления бактерий нами был введен индекс неоднородности культуры, определяемый по интенсивности ДНК-флуоресценции меченных флуорохромом бактерий с использованием проточного цитометра. Индекс рассчитывали по отношению количества клеток с относительно высоким содержанием ДНК (репликация ДНК, каналы интенсивности флуоресценции от 201 до 512 у.е. (условных единиц)) к количеству клеток с относительно низким содержанием ДНК (стационарная фаза, каналы от 0 до 200 у.е.). Через 48 ч инкубации индекс неоднородности культур авирулентных штаммов составил $0,52 \pm 0,11$, тогда как у вирулентных штаммов – $0,18 \pm 0,03$ ($p < 0,001$). Предложено пороговое значение индекса неоднородности для определения вирулентных свойств культуры – 0,25. Штаммы с индексом неоднородности $\geq 0,25$ с большей степенью вероятности можно отнести к авирулентным, а штаммы с индексом неоднородности $< 0,25$ – к вирулентным. Данный метод может быть рекомендован как дополнительный для включения в комплекс методов оценки вирулентности штаммов чумного микроба.

Иммунологический метод. Ключевая роль в развитии патологического процесса при инфекционных болезнях принадлежит повреждению клеток организма хозяина, которое зависит от степени вирулентности инфицирующих агентов [25–27]. Штаммы возбудителя чумы обладают разной цитотоксичностью по отношению к лейкоцитам крови человека *in vitro*. При сопоставлении результатов проточно-цитометрического анализа цитотоксичности штаммов *Y. pestis* и их молекулярно-генетической характеристики с показателями

ЛД₅₀ для белых мышей выяснили, что вирулентные штаммы (ЛД₅₀ $< 1 \times 10^4$ м.к.) с генотипом *pgm*⁺*pFra*⁺*pCad*⁺*pPst*⁺ вызывают повреждение более 80% лейкоцитов крови человека, тогда как слабовирулентные и авирулентные штаммы (ЛД₅₀ $> 1 \times 10^5$ м.к.) с генотипами *pgm*⁺*pFra*⁺*pCad*⁺*pPst*⁺, *pgm*⁻*pFra*⁺*pCad*⁺*pPst*⁺, *pgm*⁺*pFra*⁺*pCad*⁻*pPst*⁺, *pgm*⁺*pFra*⁻*pCad*⁺*pPst*⁺ вызывают повреждение менее 50% лейкоцитов [28]. Сравнительный анализ цитотоксичности исследованных штаммов *Y. pestis* и их ЛД₅₀ свидетельствовал о высокой степени корреляции данных показателей (слабовирулентные и авирулентные штаммы – $r_s = 0,9$; вирулентные – $r_s = 0,7$). Очевидно, лейкоциты человека не являются стандартным препаратом, но именно кровь является одним из наиболее информативных и доступных материалов (биоматериалов) при изучении вирулентности штаммов возбудителя чумы непосредственно для человека, что обуславливает перспективность включения данного подхода в комплекс методов оценки вирулентности штаммов чумного микроба.

Вирулентность возбудителя чумы обусловлена способностью патогена выживать и размножаться внутри макрофагов («репликативной ниши») за счет подавления антибактериальных функций фагоцитов [29]. Репликация бактерий внутри макрофагов коррелирует с понижением содержания в них NO. Предполагают, что за подавление индукции NO ответственны белки *rip*-оперона (*required for intracellular proliferation*) *pgm* локуса *RipA*, *RipB* и *RipC* [30–32]. Мутантные по этим генам штаммы не способны выживать и размножаться внутри макрофагов [30].

Отдельно обозначим менее известные факторы, качественное и количественное определение которых может свидетельствовать о вирулентности штаммов *Y. pestis*.

Полифункциональные белки наружной мембраны, такие как SurA (Survival protein A), липопропротеин Брауна (Lpp), липопротеин NlpD, а также один из добавочных поверхностных белков – интимин/инвазин-подобный белок (Iip) чумного микроба, рассматривают как потенциальные факторы вирулентности [33–36]. Установлено, что делеционные мутанты вирулентных штаммов *Y. pestis* по генам этих белков обладают сниженной вирулентностью [33, 37, 38].

Считают, что развитию самой опасной формы чумы, легочной, способствует поверхностная протеаза омптинового типа возбудителя чумы – активатор плазминогена Pla [39], которая совместно с интегральным белком наружной мембраны Ail обеспечивает устойчивость чумного микроба к комплементу сыворотки крови [40, 41], прикрепление бактерий к макрофагам [42] и проникновение патогена внутрь клеток млекопитающих [43]. Штаммы, лишённые Pla, характеризуются увеличением ЛД₅₀ в миллион раз [44, 45]. Утрата Ail также приводит к снижению вирулентности патогена. Так, при экспериментальной легочной чуме показатель ЛД₅₀ мутантного по этому белку штамма для крыс увеличился более чем в 10 000 раз [46].

Антиоксидантная система микроорганизмов также является фактором патогенности [47–49]. Чумной микроб, попадая в фагоцит и подвергаясь губительному воздействию активных форм кислорода, выработал свою стратегию выживания в данных условиях – антиоксидантную систему, в которую входят ферменты каталазы и пероксидазы. Следует отметить, что корреляция между каталазной активностью

Y. pestis и вирулентностью обнаружена еще в 1949 г. [50]. Каталазную и пероксидазную активность чумного микроба изучали как отечественные исследователи (Джапаридзе М.Н. [51], Видяева Н.А. [52]), так и зарубежные (Garcia E. et al. [53], Marcheva D. [54], Mehig R.J., Brubaker R.R. [55]).

Известно, что на первых этапах развития инфекционного процесса сидерофор иерсиниабактин Ybt возбудителя чумы ассимилирует железо, концентрация которого в чувствительном организме резко снижается в ответ на внедрение патогена. Ybt, в отличие от сидерофоров энтеробактерий, не блокируется липокалином-2 макроорганизма и способствует размножению бактерий [56], что свидетельствует о его роли в патогенезе чумы и ставит его в ряд маркеров вирулентности чумного микроба. Привлекает внимание исследователей в качестве фактора вирулентности и другой железосвязывающий протеин *Y. pestis* – YfeA (YPO2439, y1897) [57]. Белки транспортной системы Zn (2+) YbtX и ZnuABC также необходимы для проявления вирулентных свойств чумного микроба при легочной и бубонной чуме [58].

Расширение технических возможностей способствует не только детальному изучению уже известных макромолекул, но и поиску новых – потенциальных маркеров вирулентности. Технология белковых чипов SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) позволяет определить отдельные белки возбудителя чумы, имеющие отношение к вирулентности [59]. Согласно Chromy B.A. et al. [60], при изучении белковых портретов штаммов возбудителей чумы с использованием масс-спектрометрии получены 24 неизвестных «уникальных» протеина – потенциальные детерминанты вирулентности.

Цикличность существования чумного микроба в природе в различных экологических нишах, включающих чувствительный теплокровный макроорганизм и блох, подразумевает реализацию патогеном различных стратегий выживания с использованием ряда факторов патогенности. Необходимо учитывать особенности изучения вирулентности чумного микроба *in vitro*. Вирулентность чумного микроба целесообразно изучать с использованием культур, выращенных при 37°C – температуре проявления всех основных детерминант вирулентности возбудителя. Выявлено повышение вирулентности культур возбудителя чумы при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека [61], что связано, в том числе, с активацией ЛПС [62, 63].

Более полное воспроизведение сложных взаимоотношений между микро- и макроорганизмом проводят при моделировании жизнедеятельности чумного микроба в условиях *in vivo* с использованием имплантированных камер и последующим выделением белков – потенциальных маркеров вирулентности – в сравнительном анализе клеток вирулентных и авирулентных штаммов [13, 64].

Вместе с тем с температурной регуляцией факторов вирулентности возбудителя чумы не все так однозначно. По данным Spinner J.L. et al. [65], белки мультимерного токсического комплекса (YitA and YipA), которые защищают чумной микроб от фагоцитоза нейтрофилами на первом этапе инфицирования, максимально синтезируются бактериями в организме блох при температуре 21°C. Кроме того, устойчивость чумного микроба зависит не только от температуры

культивирования. Так, бактерии, выделенные из блох, обладают большей резистентностью к фагоцитозу, чем бактерии, выращенные *in vitro* [66].

Интересно заметить, что один и тот же штамм *Y. pestis* может быть в большей степени вирулентным при проявлении бубонной формы чумы, чем легочной [67], вследствие чего проводят дифференциацию факторов вирулентности по роли в той или иной форме заболевания [36, 39]. Например, в чумном микробе различают 2 системы транспорта марганца: Yfe/Sit и/или MntH. Двойной делеционный мутант по этим белкам демонстрирует 133-кратную потерю вирулентности на модели бубонной чумы у мышей, тогда как на модели легочной чумы вирулентность сохраняется на прежнем уровне [68].

Обращает на себя внимание универсальность отдельных факторов вирулентности различных патогенов. Так, *rip*-оперон, обеспечивающий возможность репликации возбудителя чумы в макрофагах, присутствует также у *Salmonella* и *Burkholderia* [69, 70]. Полифункциональные белки наружной мембраны SurA, липопротеин Брауна (Lpp), NlpD были обнаружены у других видов семейства *Enterobacteriaceae* [71–73]. Очевидно, движущие силы эволюции вирулентных микроорганизмов однонаправлены, что и объясняет единые механизмы взаимодействия с чувствительным макроорганизмом.

Полигостальность возбудителя чумы объясняет множественность проявлений патогенности и неэффективность выбора одного или единичных факторов для оценки патогенности (вирулентности) чумного микроба. Представляет интерес анализ корреляционных связей факторов вирулентности с их принадлежностью к клиническим изолятам чумного микроба, как это было сделано, например, при изучении вибрионов и аэромонад различной экологической принадлежности [74]. В целом исследования, направленные на поиск новых факторов вирулентности чумного микроба, расширяют горизонты нашего представления о патогенезе и иммуногенезе чумы и могут быть использованы для увеличения панели маркеров патогенности *Y. pestis*.

Таким образом, нами обозначены подходы к оценке вирулентности штаммов возбудителя чумы *in vitro*. Наличие генетических маркеров патогенности микроба – первостепенная составляющая вирулентности, анализ экспрессии этих генов – еще один важный шаг на пути дифференциации штаммов по данному показателю. Однако регламентированный комплексный подход к определению вирулентности чумного микроба. В связи с этим результаты, полученные с помощью методов *in vitro*, необходимо сопоставлять с показателем ЛД₅₀ для каждого изучаемого штамма.

Возможные направления развития методических подходов к оценке вирулентности чумного микроба *in vitro* – детекция отдельных молекул нуклеиновых кислот, имеющих отношение к вирулентности, в изотермических условиях [29, 75], создание экспрессных тестов детекции факторов вирулентности для работы в полевых условиях (прототип – иммунохромаграфический тест, но в мультиплексном варианте). Совершенствование методических подходов оценки вирулентности чумного микроба повысит доказательность, рациональность и эффективность профилактических мероприятий при чуме.

Информация о финансировании

Статья подготовлена за счет средств федерального бюджета.

Financial support

The article was prepared at the expense of the federal budget.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность за редактирование и поддержку в написании статьи Ю.А.Попову, д.м.н., профессора, и.о. заведующей отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора

Литература

1. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21.
2. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.3.2355-08.
3. Ben-Gurion R, Hertman J. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. J Gen Microbiol. 1958 Oct;19(2):289-97. DOI: 10.1099/00221287-19-2-289
4. Higuchi KA, Smith JL. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. J Bacteriol. 1961 Apr;81(4):605-8. DOI: 10.1128/jb.81.4.605-608.1961
5. Jackson S, Burrows TW. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. Br J Exp Pathol. 1956 Dec;37(6):577-83.
6. Madison RR. Fibriolytic specificity of *Bacterium pestis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1936;34(3):301-2.
7. Апарин ГП, Тимофеева ЛА. К методике определения вирулентности чумного микроба. Докл. Иркут. противочум. ин-та. 1969;8:35-7.
8. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. Онищенко ГГ, Кутырева ВВ. М., 2013, 560 с.
9. Russel WMS, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen and Co. Ltd. 1959, pp. 252.
10. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. ALTEX. 2002;19(2):73-8.
11. Булгакова ЕГ, Сухоносков ИЮ, Кутырев ВВ. Способ определения утраты вирулентности штаммами чумного микроба вследствие потери области пигментации. Патент на изобретение RUS 2288275 27.11.2006.
12. Куклев ВЕ, Осина НА, Бугоркова ТВ, Кутырев ВВ. Набор и способ ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент на изобретение RUS 2473701 27.01.2013.
13. Соломенцев ВИ, Кадникова ЛА, Кисличкина АА, Майская НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, и др. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Бактериология. 2017;2(2):30-5. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35
14. Andersson JA, Sha J, Erova TE, Fitts EC, Ponnusamy D, Kozlova EV, Kirtley ML, Chopra AK. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Oct 17;7:448. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00448
15. Подладчикова ОН. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;3:33-40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40
16. Galindo CL, Sha J, Moen ST, Agar SL, Kirtley ML, Foltz SM, et al. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* C092 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures. Comp Funct Genomics. 2010;2010:342168. DOI: 10.1155/2010/342168
17. Kim TJ, Chauhan S, Motin VL, Goh EB, Igo MM, Young GM. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol. 2007 Dec;189(24):8890-900. DOI: 10.1128/JB.00972-07
18. Zhan L, Yang L, Zhou L, Li Y, Gao H, Guo Z, et al. Direct and negative regulation of the *sycO-ypkA-yopJ* operon by cyclic AMP receptor protein (CRP) in *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2009 Aug 25;9:178. DOI: 10.1186/1471-2180-9-178
19. Дятлов ИА, Кутырев ВВ, Храмов МВ. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М., 2012, 415 с.
20. Домарадский ИВ. Чума. М.: «Медицина»; 1998, 176 с.
21. Кравцов АЛ. Проточно-цитофлуориметрическое исследование бактерицидных гранул в фагоцитах крови животных с различной видовой чувствительностью к экспериментальному заражению чумой. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2015;1:23-31.
22. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):379-414. DOI: 10.1128/CMR.16.3.379-414.2003
23. Дмитриевский АМ. Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994, с. 15-16.
24. Анисимов АП. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002;3:3-23.
25. Сомова ЛМ, Шубин ФН, Дробот ЕИ, Плехова НГ, Ляпун ИН. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2016;6:74-85. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-74-85
26. Brodsky IE, Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits *in vivo* cell death but enhances bacterial virulence. PLoS Pathog. 2008;4:e1000067. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000067
27. Monack D, Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy. Int J Med Microbiol. 2000 Mar;290(1):7-13. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80096-X
28. Сазанова ЕВ, Шмелькова ТП, Кравцов АЛ, Малюкова ТА, Попов ЮА. Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2017;6:3-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9
29. Пустовалов ВЛ, Васильева ГИ, Киселева АК. Устойчивость к фагоцитозу вирулентных штаммов чумного микроба в зависимости от температуры культивирования. Вопросы профилактики природноочаговых инфекций. Саратов, 1983.
30. Pujol C, Grabenstein JP, Perry RD, Bliska JB. Replication of *Yersinia pestis* in interferon gamma-activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 6;102(36):12909-14. DOI: 10.1073/pnas.0502849102
31. Torres R, Swift RV, Chim N, Wheatley N, Lan B, Atwood BR, et al. Biochemical, structural and molecular dynamics analyses of the potential virulence factor RipA from *Yersinia pestis*. PLoS One. 2011;6(9):e25084. DOI: 10.1371/journal.pone.0025084
32. Torres R, Chim N, Sankaran B, Pujol C, Bliska JB, Goulding CW. Structural insights into RipC, a putative citrate lyase β subunit from a *Yersinia pestis* virulence

- operon. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012 Jan 1;68(Pt 1):2-7. DOI: 10.1107/S1744309111048056
33. Southern SJ, Scott AE, Jenner DC, Ireland PM, Norville IH, Sarkar-Tyson M. Survival protein A is essential for virulence in *Yersinia pestis*. Microb Pathog. 2016 Mar;92:50-53. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.013
 34. Sha J, Agar LS, Baze WB, Olano JP, Fad AA, Erova TE, et al. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of *Yersiniae*: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. Infect Immun. 2008 Apr;76(4):1390-409. DOI: 10.1128/IAI.01529-07
 35. Tidhar A, Flashner Y, Cohen S, Levi Y, Zauberman A, Gur D, et al. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. PLoS One. 2009 Sep 14;4(9):e7023. DOI: 10.1371/journal.pone.0007023
 36. 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
 37. Sha J, Kirtley LM, van Lier CJ, Wang S, Erova TE, Kozlova EV, et al. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. Infect Immun. 2013 Mar;81(3):815-28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12
 38. Dentovskaya SV, Ivanov SA, Kopylov PKh, Shaikhutdinova RZ, Platonov ME, Kombarova TI, Gapeľchenkova TV, Balakhonov SV, Anisimov AP. Selective Protective Potency of *Yersinia pestis* Δ nlpD Mutants. Acta Naturae. 2015 Jan-Mar;7(1):102-8.
 39. 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
 40. Eren E, van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23971-6. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418
 41. 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
 42. Ke Y, Chen Z, Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Dec 24;3:106. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00106
 43. 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
 44. Sebbane F, Jarrett C, Gardner D, Long D, Hinnebusch B. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(14):5526-5530. DOI: 10.1073/pnas.0509544103
 45. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. Science. 1992;258(5084):1004-7. DOI: 10.1126/science.1439793
 46. Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Callison JA, Gardner D, Buchanan SK, Plano GV. Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. Infect Immun. 2011;79(12):4984-9. DOI: 10.1128/IAI.05307-11
 47. Курбанов АИ. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности. Международный медицинский журнал. 2009;15(1):136-9.
 48. Beaman B, Black C, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun. 1985;47:135-41.
 49. Mandell G. Catalase, superoxide dismutase and virulence in *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. J Clin Invest. 1975;55:561-66.
 50. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1949;71:99-101.
 51. Джапаридзе МН. Влияние условий выращивания на каталазную активность чумного и псевдотуберкулезного микробов. Труды института «Микроб». 1960;4:148-51.
 52. Видяева НА, Гаева АВ, Куклева ЛМ, Одинокоев ГН, Кутырев ВВ. Сравнительная характеристика антиокислительных ферментов штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;96:29-32.
 53. Garcia E, Nedialkov YA, Elliott J, Motin VL, Brubaker RR. Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. J Bacteriol. 1999 May;181(10):3114-22. DOI: 10.1128/JB.181.10.3114-3122.1999
 54. Marcheva D, Nicolova S, Veljanov D. О распространении каталазной активности у бактерий рода *Yersinia*. Докл. Болг. АН. 1988;41(3):57-60.
 55. Mehig R, Brubaker R. Major stable peptides of *Yersinia pestis* synthesized during the low-calcium response. Infect Immun. 1993;61(1):13-22.
 56. Perry R, Fetherston J. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. Microbes Infect. 2011;13(10):808-17. DOI.org/10/106/j.micinf.2011.04.008
 57. Radka CD, DeLucas LJ, Wilson LS, Lawrenz MB, Perry RD, Aller SG. Crystal structure of *Yersinia pestis* virulence factor YfeA reveals two polyspecific metal-binding sites. Acta Crystallogr D Struct Biol. 2017 Jul 1;73(Pt 7):557-572. DOI: 10.1107/S2059798317006349
 58. Bobrov AG, Kirillina OA, Fosso MY, Fetherston JD, Miller MC, VanCleave TT, et al. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice. Metallomics. 2017;9(6):757-772. DOI: 10.1039/c7mt00126f
 59. Thulasiraman V, McCutchen-Maloney SL, Motin VL, Garcia E. Detection and identification of virulence factors in *Yersinia pestis* using SELDI ProteinChip system. Biotechniques. 2001 Feb;30(2):428-32. DOI: 10.2144/01302pf02
 60. Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, Gonzales AD, Corzett CH, Chang BC, Fitch JP, McCutchen-Maloney SL. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. J Bacteriol. 2005 Dec;187(23):8172-80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005
 61. Кравцов АН Тынянова ВИ, Зюзина ВП. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1993;4:3-9.
 62. Тынянова ВИ, Демидова ГВ, Зюзина ВП, Анисимов БИ, Плетницкий АЭ. Гликолипид – биоактиватор токсических субстанций чумного микроба. Биотехнология. 1999;2:28-33.
 63. Тынянова ВИ, Зюзина ВП, Демидова ГВ, Соколова ЕП. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016;3:104-12.
 64. Куляш ГЮ, Головки ЕМ, Ляпин МН. Изучение белковой экспрессии *Yersinia pestis* в динамике длительного культивирования *in vivo*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1991;8:16-20.
 65. Spinner JL, Carmody AB, Jarrett CO, Hinnebusch BJ. Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun. 2013;81(11):4041-52. DOI: 10.1128/IAI.00648-13
 66. 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;6(2): e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783
 67. 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
 68. Perry RD, Craig SK, Abney J, Bobrov AG, Kirillina O, Mier I, et al. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of

- Yersinia pestis*. Microbiology (Reading). 2012 Mar;158(Pt 3):804-815. DOI: 10.1099/mic.0.053710-0
69. Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. FEMS Microbiol Lett. 2009 Aug;297(2):241-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01686.x
 70. Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, et al. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. J Biol Chem. 2006 Sep 29;281(39):29131-40. DOI: 10.1074/jbc.M604640200
 71. Tormo A, Almirón M, Kolter R. *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. J Bacteriol. 1990 Aug;172(8):4339-47. DOI: 10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990
 72. Hantke K, Braun V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. Eur J Biochem. 1973 Apr;34(2):284-96. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02757.x
 73. Lange R, Hengge-Aronis R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. Mol Microbiol. 1994 Aug;13(4):733-43. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00466.x
 74. Бухарин ОВ, Бойко АВ, Журавлева ЛА. Факторы персистенции и (или) патогенности вибрионов и аэромонад различной экологической принадлежности. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1998;5:30-33.
 75. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321
- virulent and avirulent strains of *Yersinia pestis*, determination of their plasmid profile. Patent for the invention RUS 2473701 27.01.2013. (In Russian).
13. Solomentsev VI, Kadnikova LA, Kislichkina AA, Mayskaya NV, Kombarova TI, Platonov ME, et al. Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, different by virulence for guinea pigs. Bacteriology. 2017;2(2):30-5. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35 (In Russian).
 14. Andersson JA, Sha J, Erova TE, Fitts EC, Ponnusamy D, Kozlova EV, Kirtley ML, Chopra AK. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Oct 17;7:448. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00448
 15. Podladchikova ON. Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2017;3:33-40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40 (In Russian).
 16. Galindo CL, Sha J, Moen ST, Agar SL, Kirtley ML, Foltz SM, et al. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* C092 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures. Comp Funct Genomics. 2010;2010:342168. DOI: 10.1155/2010/342168
 17. Kim TJ, Chauhan S, Motin VL, Goh EB, Igo MM, Young GM. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol. 2007 Dec;189(24):8890-900. DOI: 10.1128/JB.00972-07
 18. Zhan L, Yang L, Zhou L, Li Y, Gao H, Guo Z, et al. Direct and negative regulation of the *sycO-ypkA-yopJ* operon by cyclic AMP receptor protein (CRP) in *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2009 Aug 25;9:178. DOI: 10.1186/1471-2180-9-178
 19. Dyatlov IA, Kutuyev VV, Khramov MV. Nutrient media for isolation, cultivation and identification of pathogens of particularly dangerous bacterial infections. Moscow, 2012, 415 p. (In Russian).
 20. Domaradskii IV. The plague. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1998, 176 p. (In Russian).
 21. Kravtsov AL. Flow-cytofluorometric study of bactericidal granules in blood phagocytes of animals with various species sensitivity to experimental plague infection. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2015;1:23-31. (In Russian).
 22. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):379-414. DOI: 10.1128/CMR.16.3.379-414.2003
 23. Dmitrovskii AM. Prevention and measures to combat the plague. Proceedings of the Scientific Conference dedicated to the 100th anniversary of the discovery of the causative agent of the plague (September 6–7, 1994, Almaty). Almaty, 1994, pp. 15–16. (In Russian).
 24. Anisimov AP. *Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1. Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya). 2002;3:3-23. (In Russian).
 25. Somova LM, Shubin FN, Drobot EI, Plekhova NG, Lyapun IN. Plasmid-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and infectious process. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2016;6:74-85. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-74-85 (In Russian).
 26. Brodsky IE, Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits *in vivo* cell death but enhances bacterial virulence. PLoS Pathog. 2008;4:e1000067. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000067
 27. Monack D, Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy. Int J Med Microbiol. 2000 Mar;290(1):7-13. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80096-X
 28. Sazanova EV, Shmelkova TP, Kravtsov AL, Malyukova TA, Popov YuA. Flow-cytofluorimetric analysis of cytotoxicity of *Yersinia pestis* strains. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2017;6:3-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9 (In Russian).
 29. Pustovalov VL, Vasil'eva GI, Kiseleva AK. Resistance to phagocytosis of virulent strains of the plague microbe depending on the cultivation temperature. Issues of prevention of natural focal infections. Saratov, 1983. (In Russian).

References

1. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. SanPiN 3.3686-21. (In Russian).
2. Organization and conduct of epidemiological surveillance in natural plague foci on the territory of the Russian Federation. MU 3.1.3.2355-08. (In Russian).
3. Ben-Gurion R, Hertman J. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. J Gen Microbiol. 1958 Oct;19(2):289-97. DOI: 10.1099/00221287-19-2-289
4. Higuchi KA, Smith JL. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. J Bacteriol. 1961 Apr;81(4):605-8. DOI: 10.1128/jb.81.4.605-608.1961
5. Jackson S, Burrows TW. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. Br J Exp Pathol. 1956 Dec;37(6):577-83.
6. Madison RR. Fibriolytic specificity of *Bacterium pestis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1936;34(3):301-2.
7. Aparin GP, Timofeeva LA. K metodike opredeleniya virulentnosti chumnogo mikroba. Proceedings of Irkutsk Antiplague Institute. 1969;8:35-7. (In Russian).
8. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Edited by Onishchenko GG, Kutuyev VV. Moscow, 2013, 560 p. (In Russian).
9. Russel WMS, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen and Co. Ltd. 1959, pp. 252.
10. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. ALTEX. 2002;19(2):73-8.
11. Bulgakova EG, Sukhonosov IYu, Kutuyev VV. A method for determining the loss of virulence by plague microbe strains due to the loss of pigmentation area. Patent for the invention RUS 2288275 27.11.2006. (In Russian).
12. Kuklev VE, Osina NA, Bugorkova TV, Kutuyev VV. A set and a method for accelerated identification of a plague microbe with simultaneous differentiation of

30. Pujol C, Grabenstein JP, Perry RD, Bliska JB. Replication of *Yersinia pestis* in interferon gamma-activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12909-14. DOI: 10.1073/pnas.0502849102
31. Torres R, Swift RV, Chim N, Wheatley N, Lan B, Atwood BR, et al. Biochemical, structural and molecular dynamics analyses of the potential virulence factor RipA from *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2011;6(9):e25084. DOI: 10.1371/journal.pone.0025084
32. Torres R, Chim N, Sankaran B, Pujol C, Bliska JB, Goulding CW. Structural insights into RipC, a putative citrate lyase β subunit from a *Yersinia pestis* virulence operon. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012 Jan 1;68(Pt 1):2-7. DOI: 10.1107/S1744309111048056
33. Southern SJ, Scott AE, Jenner DC, Ireland PM, Norville IH, Sarkar-Tyson M. Survival protein A is essential for virulence in *Yersinia pestis*. *Microb Pathog*. 2016 Mar;92:50-53. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.013
34. Sha J, Agar LS, Baze WB, Olano JP, Fad AA, Erova TE, et al. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of *Yersiniae*: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1390-409. DOI: 10.1128/IAI.01529-07
35. Tidhar A, Flashner Y, Cohen S, Levi Y, Zauberman A, Gur D, et al. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. *PLoS One*. 2009 Sep 14;4(9):e7023. DOI: 10.1371/journal.pone.0007023
36. 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
37. Sha J, Kirtley LM, van Lier CJ, Wang S, Erova TE, Kozlova EV, et al. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infect Immun*. 2013 Mar;81(3):815-28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12
38. Dentovskaya SV, Ivanov SA, Kopylov PKh, Shaikhutdinova RZ, Platonov ME, Kombarova TI, Gapel'chenkova TV, Balakhonov SV, Anisimov AP. Selective Protective Potency of *Yersinia pestis* Δ nlpD Mutants. *Acta Naturae*. 2015 Jan-Mar;7(1):102-8.
39. 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
40. Eren E, van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2012 Jul 6;287(28):23971-6. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418
41. 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
42. Ke Y, Chen Z, Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Dec 24;3:106. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00106
43. 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
44. Sebbane F, Jarrett C, Gardner D, Long D, Hinnebusch B. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(14):5526-5530. DOI: 10.1073/pnas.0509544103
45. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992;258(5084):1004-7. DOI: 10.1126/science.1439793
46. Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Callison JA, Gardner D, Buchanan SK, Plano GV. Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. *Infect Immun*. 2011;79(12):4984-9. DOI: 10.1128/IAI.05307-11
47. Kurbanov AI. Antioxidant enzymes of microorganisms as potential factors of pathogenicity. *International Medical Journal*2009;15(1):136-9. (In Russian).
48. Beaman B, Black C, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*. 1985;47:135-41.
49. Mandell G. Catalase, superoxide dismutase and virulence in *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J Clin Invest*. 1975;55:561-66.
50. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949;71:99-101.
51. Dzhaparidze MN. Influence of growing conditions on catalase activity of plague and pseudotuberculous microbes. *Proceedings of the Microbe Institute*.1960;4:148-51. (In Russian).
52. Vidyayeva NA, Gaeva AV, Koukleva LM, Odinkov GN, Kutuyev VV. Comparative characteristics of antioxidative enzymes of *Yersinia pestis* strains of different subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2008;96:29-32. (In Russian).
53. Garcia E, Nedialkov YA, Elliott J, Motin VL, Brubaker RR. Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*. 1999 May;181(10):3114-22. DOI: 10.1128/JB.181.10.3114-3122.1999
54. Marcheva D, Nicolova S, Veljanov D. O rasprostraneni katalaznoi aktivnosti u bakterii roda *Yersinia*. *Dokl. Bolg. AN*. 1988;41(3):57-60. (In Russian).
55. Mehig R, Brubaker R. Major stable peptides of *Yersinia pestis* synthesized during the low-calcium response. *Infect Immun*. 1993;61(1):13-22.
56. Perry R, Fetherston J. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect*. 2011;13(10):808-17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008
57. Radka CD, DeLucas LJ, Wilson LS, Lawrenz MB, Perry RD, Aller SG. Crystal structure of *Yersinia pestis* virulence factor YfeA reveals two polyspecific metal-binding sites. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 2017 Jul 1;73(Pt 7):557-572. DOI: 10.1107/S2059798317006349
58. Bobrov AG, Kirillina OA, Fosso MY, Fetherston JD, Miller MC, VanCleave TT, et al. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice. *Metallomics*. 2017;9(6):757-772. DOI: 10.1039/c7mt00126f
59. Thulasiraman V, McCutchen-Maloney SL, Motin VL, Garcia E. Detection and identification of virulence factors in *Yersinia pestis* using SELDI ProteinChip system. *Biotechniques*. 2001 Feb;30(2):428-32. DOI: 10.2144/01302pf02
60. Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, Gonzales AD, Corzett CH, Chang BC, Fitch JP, McCutchen-Maloney SL. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J Bacteriol*. 2005 Dec;187(23):8172-80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005
61. Kravtsov AN, Tynyanova VI, Zyuzina VP. Povyshenie virulentnosti bakterii *Yersinia pestis* pri inkubatsii kletok v gemolizirovannykh eritrotsitakh krovi cheloveka. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1993;4:3-9. (In Russian).
62. Tynyanova VI, Demidova GV, Zyuzina VP, Anisimov BI, Pletnitskii AE. Glikolipid – bioaktivator toksicheskikh substantsii chumnogo mikroba. *Biotechnologiya (Biotechnology)*. 1999;2:28-33. (In Russian).
63. Tynyanova VI, Zyuzina VP, Demidova GV, Sokolova EP. Specificity of immune modulating effect of *Yersinia pestis* endotoxin. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2016;3:104-12.
64. Kulyash GYu, Golovko EM, Lyapin MN. Izuchenie belkovoi ekspressii *Yersinia pestis* v dinamike dlitel'nogo kul'tivirovaniya *in vivo*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya)*. 1991;8:16-20. (In Russian).

65. Spinner JL, Carmody AB, Jarrett CO, Hinnebusch BJ. Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 2013;81(11):4041-52. DOI: 10.1128/IAI.00648-13
66. 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;6(2): e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783
67. 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
68. Perry RD, Craig SK, Abney J, Bobrov AG, Kirillina O, Mier I, et al. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbiology (Reading)*. 2012 Mar;158(Pt 3):804-815. DOI: 10.1099/mic.0.053710-0
69. Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Aug;297(2):241-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01686.x
70. Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, et al. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):29131-40. DOI: 10.1074/jbc.M604640200
71. Tormo A, Almirón M, Kolter R. *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J Bacteriol*. 1990 Aug;172(8):4339-47. DOI: 10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990
72. Hantke K, Braun V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem*. 1973 Apr;34(2):284-96. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02757.x
73. Lange R, Hengge-Aronis R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol Microbiol*. 1994 Aug;13(4):733-43. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00466.x
74. Bukharin OV, Boiko AV, Zhuravleva LA. Factors of persistence and (or) pathogenicity in vibrios and aeromonads belonging to different ecotopes. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1998;5:30-33. (In Russian).
75. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321

Информация об авторах:

Сазанова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Information about authors:

Elena V. Sazanova, PhD (Biological Sciences), Researcher of the Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

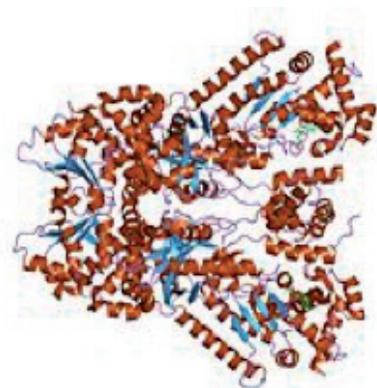
Tatyana A. Malyukova, MD, PhD, Leading Researcher of the Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Новое исследование показывает, как европейцы выработали большую сопротивляемость сибирской язве

На протяжении тысячелетий люди и сибирская язва развивались совместно. Согласно исследованию в *Nature Communications* из лаборатории Чарльза Данко, это привело к тому, что у людей, особенно у людей европейского происхождения, вырабатывалось меньше рецепторов сибирской язвы, которые позволяют болезни закрепиться в организме.

Развитие животноводства и охоты увеличило подверженность человека зоонозным патогенам. Чтобы понять, как зоонозное заболевание могло повлиять на эволюцию человека, изучали изменения экспрессии у человека рецептора токсина сибирской язвы 2 (ANTXR2), который кодирует белок клеточной поверхности, необходимый для токсинов вирулентности *Bacillus anthracis*, вызывающих сибирскую язву. В иммунных клетках ANTXR2 подавляется в 8 раз во всех доступных человеческих образцах по сравнению с нечеловеческими приматами, что указывает на регуляторные изменения на ранней стадии эволюции современного человека. Обнаружены множественные генетические признаки, согласующиеся с недавним положительным отбором, приводящим к специфическому для Европы снижению экспрессии ANTXR2 во множестве тканей, пораженных токсинами сибирской язвы. Эти наблюдения соответствуют модели, в которой люди адаптировались к болезни сибирской язвы после ранних экологических изменений, связанных с охотой, а также во второй период адаптации после подъема современного сельского хозяйства.



Choate LA, Barshad G, McMahon PW, Said I, Rice EJ, Munn PR, Lewis JJ, Danko CG. Multiple stages of evolutionary change in anthrax toxin receptor expression in humans. *Nat Commun*. 2021 Nov 15;12(1):6590. DOI: 10.1038/s41467-021-26854-z.

Перспективность сочетания различных детекционных технологий для создания индикации целевых ПБА-тест-систем, выявляющих патогены с максимальными показателями экспрессности, автономности, чувствительности и специфичности

С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов

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

В обзоре рассматриваются современные методы детекционных технологий для индикации патогенных биологических агентов (ПБА). Анализируются высокочувствительные методы индикации ПБА, сочетающиеся с высокой достоверностью и относительной простотой проведения анализа, применение которых возможно в лабораториях с минимальным оснащением, в том числе полевых и передвижных. На основании проделанного анализа индикации целевых ПБА-тест-систем перспективным сочетанием для выявления патогенов представляется использование магнитной сепарации, магнитофоретической хроматографии и амплификации нуклеиновых кислот (LAMP).

Ключевые слова: тест-системы, методы обнаружения патогенов

Для цитирования: Игнатов С.Г., Бикетов С.Ф. Перспективность сочетания различных детекционных технологий для создания индикации целевых ПБА-тест-систем, выявляющих патогены с максимальными показателями экспрессности, автономности, чувствительности и специфичности. Бактериология. 2021; 6(4): 79–83. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-79-83

The perspective of a combination of various detection technologies for creating an indication of target PBA test systems that detect pathogens with maximum rates of rapidity, autonomy, sensitivity and specificity

S.G.Ignatov, S.F.Biketov

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

The review discusses modern methods of detection technologies for the indication of pathogenic biological agents (PBA). Highly sensitive methods of PBA indication are analyzed, combined with high reliability and relative simplicity of the analysis, the use of which is possible in laboratories with minimal equipment, including field and mobile conditions. Based on the analysis of the indication of target PBA test systems, the use of magnetic separation, magnetophoretic chromatography and nucleic acid amplification (LAMP) seems to be a promising combination for the detection of pathogens.

Key words: test-systems, methods for detecting pathogens

For citation: Ignatov S.G., Biketov S.F. The perspective of a combination of various detection technologies for creating an indication of target PBA test systems that detect pathogens with maximum rates of rapidity, autonomy, sensitivity and specificity. Bacteriology. 2021; 6(4): 79–83. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-79-83

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0773
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 03.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 360773
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 03.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

Детекция патогенных биологических агентов (ПБА) является важнейшей задачей в предотвращении заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами. Для контроля ПБА необходимы эффективные методы обнаружения, которые постоянно разрабатываются и модифицируются не только с помощью обычных микробиологических методов, но и с применением последних достижений в области физики, химии и других естественных наук. Стандартные микробиологические методы являются обычной практикой в течение почти столетия и по-прежнему успешно применяются для детектирования бактерий. Наряду с микробиологическими методами используются и другие подходы – хорошо известные методы оценки по потреблению кислорода [1, 2], иммунологические методы [3], применение атомно-силовой микроскопии для идентификации клеточных фрагментов [4] и система «искусственного носа» [5]. Рассмотрим наиболее популярные современные методы детекции ПБА.

Микробиологические методы

Эти методы основаны на выделении ПБА из исследуемого образца путем посева на селективные питательные среды с последующей идентификацией микробиологическими, биохимическими и серологическими тестами. Однако все эти процедуры довольно длительны и требуют подготовленного персонала.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР – это метод, разработанный в 1980-х гг., основанный на идентификации ПБА по наличию маркерных участков ДНК путем их амплификации при помощи специфических праймеров нуклеиновых кислот. По сравнению с микробиологическими методами молекулярные методы, обычно основанные на количественной оценке и идентификации конкретных геномных сегментов патогена, обеспечивают быстрое, высоко-специфичное и более чувствительное обнаружение ПБА.

Некоторыми примерами разработанных методов ПЦР для количественного определения бактерий являются ПЦР в реальном времени, мультиплексная ПЦР и ПЦР с обратной транскриптазой. ПЦР требует гораздо меньше времени, чем другие традиционные методы с использованием культивирования и посева бактерий. Анализ обычно занимает от 5 до 24 ч для получения результата, но это зависит от конкретной вариации ПЦР и исключает стадии обогащения. Мультиплексная ПЦР позволяет одновременно обнаруживать несколько организмов путем введения разных праймеров для амплификации участка ДНК, кодирующего специфические гены каждого бактериального штамма, являющегося мишенью. В режиме ПЦР в реальном времени можно получить более быстрые результаты без необходимости манипуляций. этапов распознавания. Результаты ПЦР в реальном времени получают путем обнаружения излучения флуоресценции специфического красителя, который прикрепляется к целевому ампликону. Основными недостатками метода являются длительность анализа и необходимость специального оборудования для обнаружения продуктов амплификации [6]. Кроме того, для проведения анализов необходим обученный персонал с экспериментальными навыками, что делает системы на основе ПЦР непрактичными в условиях ограниченных ресурсов [7, 8].

Применение магнитных наночастиц на основе оксида железа в диагностике бактериальных инфекций

Инфекционные заболевания, вызванные бактериальными патогенами, приносят вред не только здоровью человека, но и экономике страны. Традиционный метод диагностики для выявления бактериальных патогенов часто основан на культивировании бактерий, что признано золотым стандартом в клинической диагностике бактериальных заболеваний [9]. Однако традиционный метод обнаружения, состоящий из культивирования, селективного обогащения и последующего применения инструментария детекции, является трудоемким и длительным (до 7 дней) процессом. Чтобы сократить время обнаружения и получить более точную информацию о бактериях, используются многие более продвинутые методы, включая иммуноферментные анализы [10], вестерн-блоттинг [11], ПЦР и полногеномное секвенирование [12]. Недостатком этих методов является то, что они нуждаются не только в точных и дорогих инструментах, но и в специально подготовленном персонале [13].

В течение последних нескольких лет магнитные наночастицы (МНЧ) на основе оксида железа широко изучались как платформы для обнаружения бактерий [14]. Кроме того, эти МНЧ широко используются для разделения/выделения бактерий [9], доставки лекарств [15], контрастных агентов для визуализации [16] и для магнитной гипертермии [15] для диагностики и лечения возбудителей бактериальных инфекций. Например, МНЧ могут быть функционализированы с помощью целевых молекул, таких как различные антитела, антибиотики, антимикробные пептиды, бактериофаги и аптамеры для разделения и концентрации бактерий [17]. На основе модификации поверхности МНЧ, конъюгированные с различными металлами, позволяют разрабатывать различные методы обнаружения бактерий, включая колориметрическое, флуоресцентное и поверхностно-усиленное рамановское обнаружение [18]. Помимо методов обнаружения *in vitro*, суперпарамагнитные НЧ на основе оксида железа также были продемонстрированы в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии при визуализации бактерий *in vivo* [19]. Кроме того, МНЧ с уникальными магнитными свойствами и высокой удельной поверхностью показали большие перспективы в разработке новых антибактериальных препаратов [20].

Известно, что антитела, специфичные к различным бактериям, могут быть конъюгированы на поверхности МНЧ для селективного связывания и разделения бактерий. Для усиления иммобилизации антител использовались кластеры МНЧ, разработанные методом микроэмульсии [21]. МНЧ, покрытые олеиновой кислотой, использовались в качестве прекурсора для образования магнитных нанокластеров. Благодаря свободным карбоксильным группам вокруг нанокластеров они образовывали больше сайтов конъюгации для иммобилизации N- и O-антител.

Различные антибиотики, включая ванкомицин, амоксициллин, стрептавидин и другие, широко применяются в качестве агентов для борьбы с бактериями. Ванкомицин, который может связываться с бактериальной клеточной стенкой как граммотрицательных, так и грамположительных бактерий, был признан молекулой-мишенью для специфического бактериального обнаружения [22]. В качестве гликопептид-

ного антибиотика ванкомицин может распознавать бактерии благодаря своей способности взаимодействовать с пептидогликанами на стенке бактериальной клетки. Для грамположительных бактерий ванкомицин может связываться с D-аланил-D-аланином – концевыми остатками мукопептидов на стенке бактериальной клетки [22]. Для грамотрицательных бактерий ванкомицин может связываться с остатками L-лизин-D-аланина пептидогликанов, экспрессируемых на внешней мембране бактериальных клеток [22]. Таким образом, МНЧ, функционализированные ванкомицином, считаются привлекательным типом связывающего агента для эффективной концентрации множества штаммов бактерий.

Платформы на основе МНЧ для обнаружения бактерий *in vitro*

Колориметрическое обнаружение

Колориметрическое обнаружение – это качественный анализ, основанный на вызванных бактериями изменениях цвета, видимых невооруженным глазом. Платформы на основе МНЧ были разработаны для колориметрического обнаружения бактерий. МНЧ, модифицированные моноклональными антителами (mAb), непосредственно использовались для быстрого и точного обнаружения различных бактерий на основе изменений цвета, которые возникли из агрегатов МНЧ в процессе фильтрации. Во-первых, конъюгированные с антителом МНЧ использовали для концентрирования и очистки бактерии-мишени в магнитном поле. После фильтрации через мембрану конъюгаты МНЧ, связанные или не связанные с бактериями, могут быть легко разделены вакуумным давлением, а изменения цветовых сигналов, вызванные оставшимися МНЧ, отражают количество бактерий [23]. Для *Listeria monocytogenes* эффективность улавливания конъюгатов составляла от 48 до 89% для растворов с бактериальными клетками от 2×10^3 до 2×10^1 .

Наночастицы золота (Au), которые имеют отчетливые изменения цвета, вызванные агрегацией НЧ, являются наиболее распространенными НЧ благородных металлов, которые используются при колориметрическом обнаружении [18]. Как следствие, конъюгаты МНЧ-Au являются многообещающими платформами для обнаружения бактерий. Так были разработаны конъюгаты Au, покрытые МНЧ, для обнаружения *L. monocytogenes*. После модификации поверхности золотого датчика черные МНЧ закрывали цвет золотых НЧ. После расщепления пептидной последовательности протеазой *Listeria* цвет конъюгатов изменился с черного на золотой [24]. Колориметрический метод очень удобен и не требует сложного оборудования, поэтому может использоваться как быстрый, чувствительный и экономичный инструмент для обнаружения бактерий.

Флуоресцентный анализ

Флуоресцентный анализ является более чувствительным методом и предлагает более высокий предел обнаружения, чем колориметрические методы. Благодаря низкому фону, высокой чувствительности, высокой специфичности и простоте количественного анализа флуоресцентное обнаружение широко сочетается с МНЧ для обнаружения бактерий, поскольку это новая тенденция к разработке эффективных биосенсоров для клинического использования. Более того, платформа, состоящая из магнитных и флуоресцентных

устройств, позволяет количественно определять патогены в широком диапазоне концентраций.

Комбинационное рассеяние с усилением поверхности

Рамановская спектроскопия с усилением поверхности, или комбинационное рассеяние с усилением поверхности (SERS), – это поверхностно-чувствительный метод, который усиливает комбинационное рассеяние на молекулах, адсорбированных на шероховатых металлических поверхностях, или наноструктурами, такими как плазмонно-магнитные нанотрубки кремнезема.

Метод SERS позволяет избежать длительного времени на подготовку образца и используется для обнаружения бактерий благодаря огромному усилению рамановского сигнала. Чтобы максимально использовать SERS для обнаружения и мониторинга бактерий, желательно объединить платформу МНЧ с SERS для создания метода улавливания и обнаружения бактерий [25]. Недавно такие объединенные платформы были сконструированы и модифицированы различными целевыми молекулами, такими как ванкомицин, для широкого диапазона бактерий – МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Ag}$ [13] и $\text{Ag} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ [19]. Так, было продемонстрировано, что и *Escherichia coli*, и устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA) могут эффективно улавливаться модифицированными ванкомицином МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Ag}$.

Ранее было показано, что спектры комбинационного рассеяния света бактерий напрямую связаны с компонентами клеточной стенки бактерий. Таким образом, различия в компонентах клеточной стенки бактерий делают сигналы SERS уникальными для разных штаммов бактерий. Исходя из этого, комбинированная система показывает большой потенциал для обнаружения бактериальных инфекций. Оказалось, что основной пик комбинационного рассеяния (1331 см^{-1}) показывает линейную зависимость от логарифма концентраций бактерий в диапазоне от 10^1 до 10^5 клеток/мл.

Магнитофоретическая хроматография

При анализе следовых количеств патогенов можно получить ложноотрицательный сигнал, особенно когда для обнаружения используется небольшой объем образца. Кроме того, наличие различных примесей в образцах может мешать обнаружению и снизить чувствительность. Чтобы преодолеть эти ограничения, требуется процесс предварительной обработки, который отделяет и концентрирует целевые бактерии. Фильтрация и центрифугирование – обычные методы предварительной обработки бактериальных растворов [26]. Эти методы широко используются во многих областях, поскольку они просты, быстры и недороги. Однако фильтрация и центрифугирование включают несколько этапов концентрирования и промывки целевых бактерий, что приводит к повреждению бактерий и потере образца. Кроме того, эти методы трудно интегрировать с методами обнаружения, что ограничивает автоматизацию всего процесса и производства портативных устройств. Из-за этих ограничений методы предварительной обработки с использованием МНЧ привлекли большое внимание как многообещающая альтернатива.

Магнитная сепарация в основном использует МНЧ оксида железа (Fe_3O_4) для разделения и обогащения мишеней благодаря их уникальным свойствам, включая высокую магнитную восприимчивость, суперпарамагнетизм и биосовместимость.

На основе свойства суперпарамагнетизма МНЧ можно разделить с помощью внешнего магнитного поля и повторно диспергировать без агрегации частиц. Поверхность МНЧ может быть легко функционализирована с помощью ее обработки. Затем молекулы узнавания, такие как полимеры, аптамеры и антитела, фиксируются на обработанных поверхностях [27]. Когда МНЧ, функционализированные распознающими молекулами, связаны с бактериями, комплексы бактерии-МНЧ могут быть разделены с помощью постоянных магнитов с минимальным повреждением клеток [28]. Однако обычные методы разделения на основе МНЧ требуют нескольких этапов смешивания и переноса, таких как связывание, промывка и обогащение. Кроме того, по мере увеличения объема пробы для улавливания целевых бактерий требуется от 30 мин до нескольких часов.

Магнитная сепарация – это простой и быстрый тест. Однако связывание МНЧ с бактериями-мишенями требует времени, поскольку это происходит в результате броуновских столкновений МНЧ с бактериями-мишенями в растворе. Типичное время связывания (т.е. время захвата) составляет от 30 мин до нескольких часов, в зависимости от концентрации используемых МНЧ и объема образца. Когда постоянный магнит помещается рядом с пробой, содержащей раствор МНЧ, МНЧ выравниваются вдоль линий внешнего магнитного поля, образуя своеобразную полосу (то есть виртуальный фильтр). В отличие от обычных мембранных фильтров виртуальные фильтры, содержащие МНЧ, являются гибкими, что позволяет работать с наночастицами различного размера. В результате, когда в канал вводится раствор образца, содержащий целевые бактерии, виртуальный фильтр захватывает только их. Метод виртуального фильтра является наиболее эффективным с точки зрения времени захвата и эффективности разделения.

После отделения комплексов бактерии-МНЧ от раствора образца для обнаружения бактерий-мишеней можно использовать различные устройства, такие как оптические, электрохимические датчики и датчики магнитосопротивления. Подобные методы обнаружения уже обсуждались в многочисленных обзорных статьях. Наиболее чувствительный метод обнаружения использует оптические зонды, такие как наночастицы золота, флуоресцентные красители и квантовые точки [29]. Однако как комплексы бактерий с МНЧ, так и свободные МНЧ присутствуют в растворе после магнитной сепарации, поскольку концентрация используемых МНЧ намного выше, чем концентрация бактерий-мишеней. Поскольку присутствие свободных МНЧ мешает оптическим измерениям и снижает чувствительность обнаружения, были предприняты усилия по отделению комплексов бактерии-МНЧ от свободных МНЧ. После того, как комплексы бактерии-МНЧ отделены, концентрация бактерий может быть определена с помощью различных простых методов, таких как поглощение света или колориметрия. Магнитофоретическая хроматография является удобным методом отделения свободных МНЧ от комплексов «МНЧ – целевая бактерия». Хроматография – это метод разделения растворенных в жидкости смесей, который имеет широкое применение. Традиционная хроматография основана на различии сродства компонентов смеси к твердой неподвижной фазе, тогда как магнитофоретическая хроматография основана на различии скорости осаждения МНЧ разных размеров во внешнем магнитном поле. После

того, как смесь комплексов бактерия-МНЧ и свободных МНЧ помещается в определенный объем (например, эпендорф), туда добавляется раствор вязкого полиэтиленоксида, образуя несмешанный жидкий слой. Поверхностное натяжение жидкости увеличивается с увеличением вязкости жидкости. Когда постоянный магнит помещается под эпендорф, комплексы бактерия-МНЧ и свободные МНЧ испытывают магнитные, силовые и гравитационные силы, поскольку они притягиваются к магниту. Магнитная сила пропорциональна кажущемуся объему МНЧ, что указывает на то, что скорость оседания комплексов бактерия-МНЧ выше, чем у свободных МНЧ. В результате только комплексы бактерия-МНЧ с более высокой скоростью оседания могут преодолевать поверхностное натяжение и достигать дна эпендорфа, а целевые бактерии могут быть обнаружены непосредственно невооруженным глазом. Предел обнаружения магнитофоретической хроматографии в течение 10 мин составляет 100 КОЕ/мл.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

В течение последних 20 лет изотермические тесты амплификации нуклеиновых кислот превратились в важный диагностический инструмент не только для клинического применения, но и для контроля качества пищевых продуктов и мониторинга окружающей среды. LAMP хорошо известна своей надежной, высокочувствительной и специфической амплификацией целевой ДНК, которая достигается за счет использования до шести праймеров. Кроме того, LAMP выделяется своими изотермическими и энергоэффективными требованиями к усилению, что делает ее главным кандидатом для недорогой диагностики и анализа в случае необходимости [30]. Ключевыми отличиями LAMP от ПЦР являются: 1) изотермическая амплификация при 60–65°C; 2) более высокая специфичность амплификации благодаря наличию нескольких праймеров, что уменьшает вероятность перекрестного взаимодействия при контаминации чужеродной ДНК; 3) визуализация продуктов реакции не требует агарозного электрофореза, так как побочным продуктом реакции является пирофосфат магния, вызывающий видимую невооруженным глазом мутность.

Заключение

В настоящее время существует множество методов индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, однако большинство из них требуют значительных затрат времени, специального оборудования и подготовленного персонала. Создание средств экспресс-идентификации возбудителей актуальных инфекций, применение которых возможно в лабораториях с минимальным оснащением, в том числе полевых и передвижных, является актуальной задачей.

На основании проделанного анализа индикации целевых ПБА-тест-систем перспективным сочетанием для выявления патогенов представляется использование магнитной сепарации, магнитофоретической хроматографии и амплификации нуклеиновых кислот (LAMP).

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках НИОКР 1.1.13.

Funding information

The work was performed within the framework of R&D 1.1.13.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Ignatov SG, Krasil'nikov VA, Perelygin VV, Kaprel'iants AS, Ostrovskii DN. Functional and structural changes of *E. coli* membranes induced by low temperature freezing. *Biokhimiia*. 1981 Nov;46(11):1996-2003. (In Russian).
- Ignatov SG, Andreeva OV, Evdokimova OA, Artsatbanov Vlu, Perelygin VV. Repair of membrane damage caused by low temperature freezing of *E. coli* cells. *Biokhimiia*. 1982 Oct;47(10):1621-8. (In Russian).
- Korolyova-Ushakova AG, et al. Comparative Characteristics of the Diagnostic Potential of Mycobacterial Synthetic Antigens for the Serodiagnosis of Leprosy and Tuberculosis. *Appl Biochem Microbiol*. 2019;55(6):696-703.
- Dubrovina EV, Fedyukina GN, Kraevskiy SV, Ignatyuk TE, Yaminsky IV, Ignatov SG. AFM Specific Identification of Bacterial Cell Fragments on Biofunctional Surfaces. *Open Microbiol J*. 2012;6:22-8. DOI: 10.2174/1874285801206010022
- Stitzel SE, et al. Artificial nose employing microsphere sensors for detection of volatile organic compounds. Edited by Jensen JL, Burggraf LW. Boston, 2002, p. 132-7.
- Marx V. PCR heads into the field. *Nat Methods*. 2015 Apr 29;12(5):393-7. DOI: 10.1038/nmeth.3369
- Gunda NSK, Mitra SK. Rapid water quality monitoring for microbial contamination. *Electrochem Soc Interface*. 2017;25:73-8.
- Song J, Mauk MG, Hackett BA, Cherry S, Bau HH, Liu C. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Anal Chem*. 2016 Jul 19;88(14):7289-94. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01632
- Xu Y, Wang H, Luan C, Liu Y, Chen B, Zhao Y. Aptamer-based hydrogel barcodes for the capture and detection of multiple types of pathogenic bacteria. *Biosens Bioelectron*. 2018 Feb 15;100:404-410. DOI: 10.1016/j.bios.2017.09.032
- Liu CY, Weng CC, Lin CH, Yang CY, Mong KT, Li YK. Development of a novel engineered antibody targeting *Neisseria* species. *Biotechnol Lett*. 2017 Mar;39(3):407-413. DOI: 10.1007/s10529-016-2258-1
- Liana AE, Marquis CP, Gunawan C, Gooding JJ, Amal R. T4 bacteriophage conjugated magnetic particles for *E. coli* capturing: Influence of bacteriophage loading, temperature and tryptone. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Mar 1;151:47-57. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.12.009
- Váradí L, Luo JL, Hibbs DE, Perry JD, Anderson RJ, Orenka S, Groundwater PW. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chem Soc Rev*. 2017 Aug 14;46(16):4818-4832. DOI: 10.1039/c6cs00693k
- Wang C, Gu B, Liu Q, Pang Y, Xiao R, Wang S. Combined use of vancomycin-modified Ag-coated magnetic nanoparticles and secondary enhanced nanoparticles for rapid surface-enhanced Raman scattering detection of bacteria. *Int J Nanomedicine*. 2018 Feb 27;13:1159-1178. DOI: 10.2147/IJN.S150336
- Wang J, Wu H, Yang Y, Yan R, Zhao Y, Wang Y, et al. Bacterial species-identifiable magnetic nanosystems for early sepsis diagnosis and extracorporeal photodynamic blood disinfection. *Nanoscale*. 2017 Dec 21;10(1):132-141. DOI: 10.1039/c7nr06373c
- Wang X, et al. Synthesis of chitosan/poly (ethylene glycol)-modified magnetic nanoparticles for antibiotic delivery and their enhanced anti-biofilm activity in the presence of magnetic field. *J Mater Sci*. 2018;53(9):6433-49.
- Li Y, Hu X, Ding D, Zou Y, Xu Y, Wang X, et al. In situ targeted MRI detection of *Helicobacter pylori* with stable magnetic graphitic nanocapsules. *Nat Commun*. 2017 Jun 15;8:15653. DOI: 10.1038/ncomms15653. Erratum in: *Nat Commun*. 2017 Aug 30;8:16154.
- Chen J, Andler SM, Goddard JM, Nugen SR, Rotello VM. Integrating recognition elements with nanomaterials for bacteria sensing. *Chem Soc Rev*. 2017 Mar 6;46(5):1272-1283. DOI: 10.1039/c6cs00313c
- Yuan P, Ding X, Yang YY, Xu QH. Metal Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Bacterial Infection. *Adv Healthc Mater*. 2018 Jul;7(13):e1701392. DOI: 10.1002/adhm.201701392
- Li H, et al. Diagnose Pathogens in Drinking Water via Magnetic Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Assay. *Materials Today: Proceedings*. 2017;4(1):25-31.
- Ribeiro KL, Frias IAM, Franco OL, Dias SC, Sousa-Junior AA, Silva ON, et al. Clavanin A-bioconjugated Fe₃O₄/Silane core-shell nanoparticles for thermal ablation of bacterial biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018 Sep 1;169:72-81. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.04.055
- Kim YT, Kim KH, Kang ES, Jo G, Ahn SY, Park SH, et al. Synergistic Effect of Detection and Separation for Pathogen Using Magnetic Clusters. *Bioconjug Chem*. 2016 Jan 20;27(1):59-65. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00681
- Wang CH, Chang CJ, Wu JJ, Lee GB. An integrated microfluidic device utilizing vancomycin conjugated magnetic beads and nanogold-labeled specific nucleotide probes for rapid pathogen diagnosis. *Nanomedicine*. 2014 May;10(4):809-18. DOI: 10.1016/j.nano.2013.10.013
- Kim SU, Jo EJ, Mun H, Noh Y, Kim MG. Ultrasensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Immunomagnetic Separation and Selective Filtration with Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate Signal Amplification. *J Agric Food Chem*. 2018 May 16;66(19):4941-4947. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00973
- Alhogail S, Suaifan GARY, Zourob M. Rapid colorimetric sensing platform for the detection of *Listeria monocytogenes* foodborne pathogen. *Biosens Bioelectron*. 2016 Dec 15;86:1061-1066. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.043
- Liu TY, Tsai KT, Wang HH, Chen Y, Chen YH, Chao YC, et al. Functionalized arrays of Raman-enhancing nanoparticles for capture and culture-free analysis of bacteria in human blood. *Nat Commun*. 2011 Nov 15;2:538. DOI: 10.1038/ncomms1546
- Kim JH, Oh SW. Optimization of Bacterial Concentration by Filtration for Rapid Detection of Foodborne *Escherichia coli* O157:H7 Using Real-Time PCR Without Microbial Culture Enrichment. *J Food Sci*. 2019 Nov;84(11):3241-3245. DOI: 10.1111/1750-3841.14836
- Chen Y, Liu Y, Shi Y, Ping J, Wu J, Chen H. Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting. *Trends Analyt Chem*. 2020 Jun;127:115912. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115912
- Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi MA, Wolff A, Bang DD. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosens Bioelectron*. 2019 Mar 15;129:224-230. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.078
- Chen C-X, Li Y-H, Zhou Y-L, et al. Rapidly detecting antibiotics with magnetic nanoparticle coated CdTe quantum dots. *RSC Adv*. 2020;10(4):1966-70.
- Becherer L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal Methods*. 2020;12(6):717-46.

Информация о авторе:

Бикетов Сергей Федорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0065
 E-mail: biketov@obolensk.org

Information about authors:

Sergey F. Biketov, MD, PhD, Leading Researcher of the Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB Bld. 24, "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0065
 E-mail: biketov@obolensk.org

Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования

А.Е.Курилова, А.Ю.Лебедева, А.Г.Богун

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

Важнейшая задача коллекционной деятельности заключается в сохранении исходных свойств депонированных микроорганизмов. Для этого в лабораторных условиях используются несколько методических приемов. Наиболее часто используемыми из них являются два метода длительного хранения – криоконсервация и лиофильное высушивание. Непосредственно процедурам, связанным с длительным хранением, предшествуют этапы культивирования внутри лаборатории. Обычно для оценки эффективности применяемого метода консервации используют выживаемость бактериальной культуры. Фенотипическая, а особенно генетическая стабильность культуры изучаются гораздо реже. В последние 10 лет в арсенале микробиологов появился новый мощный метод изучения изменений в геноме микроорганизмов – полногеномное секвенирование. Использование данного подхода позволяет обнаруживать мутации в любом участке генома микроорганизма, в том числе не влияющие на его фенотип. В работе проведен анализ литературы, посвященной исследованию мутаций в геномах бактерий, возникающих в процессах длительного хранения и культивирования, с использованием методов полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: лиофилизация, криоконсервация, хранение микроорганизмов, повреждение ДНК, микробиологические коллекции, стресс замораживания–оттаивания

Для цитирования: Курилова А.Е., Лебедева А.Ю., Богун А.Г. Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования. Бактериология. 2021; 6(4): 84–93. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-84-93

Accumulation of mutations in the genomes of microorganisms during long-term storage and cultivation

A.E.Kurilova, A.Yu.Lebedeva, A.G.Bogun

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

Culture collections play a key role in underpinning microbiology, supplying and preserving different microorganisms with their original properties. But during the preservation of microorganisms researchers face the adaptation of microorganisms to preserving conditions, to prevent it long-term methods of preservation are used. The most popular methods are cryoconservation and freeze-drying, or lyophilization. The conditions of growing cultures before the conservation are also essential and they also can determine phenotypic and genetic properties after the preservation. The vital problem in preservation is to ensure genetic stability since the viability of cells after preservation may not necessarily correlate with the full maintenance of all properties. Usually in the experiments of long-term preservation the survival rate of the strains is estimated, but this is only a quantitative assessment, not qualitative one. Whole genome sequencing has largely been used to evaluate mutations. This method affords estimation of the mutations that even can not affect the phenotype. Our focus throughout this exercise has been on seeking to the estimation of genetic stability in microorganisms in long-term preservation and cultivation.

Key words: lyophilization, cryoconservation, cryopreservation, DNA damage, culture collections, freeze-drying, freeze-thaw stress

For citation: Kurilova A.E., Lebedeva A.Yu., Bogun A.G. Accumulation of mutations in the genomes of microorganisms during long-term storage and cultivation. Bacteriology. 2021; 6(4): 84–93. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-84-93

Для корреспонденции:

Курилова Александра Евгеньевна, аспирант, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур 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) 31-1919

Статья поступила 07.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Alexandra E. Kurilova, Post-Graduate Student, Junior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1919

The article was received 07.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

В современной микробиологии сбор и поддержание коллекций микроорганизмов являются одним из наиболее важных направлений практической деятельности. Коллекции культур микроорганизмов возникли благодаря Роберту Коху, который впервые ввел метод выделения чистых культур на искусственных средах [1]. Первая сервисная коллекция микроорганизмов была создана профессором Франтишеком Кралом в 1890 г. в Праге. Благодаря своему опыту выделения, культивирования и хранения микроорганизмов он был назначен доцентом кафедры бактериологии и уже в 1900 г. опубликовал первый каталог коллекции микроорганизмов [2]. Коллекции микроорганизмов позволяют решать фундаментальные и прикладные задачи, в том числе депонирование, хранение и распространение большого количества разнообразных микроорганизмов и обеспечение связанной с ними информации для научных, промышленных, сельскохозяйственных и медицинских целей. Основной задачей коллекционной деятельности является сохранение штаммов в неизменном состоянии и предоставление их для сравнительных экспериментов. Благодаря коллекциям микроорганизмов становится возможным уточнение таксономического положения культур с атипичным фенотипом и генотипами, исследование возбудителей. От качества материала в коллекции зависит достоверность исследований, проводимых в разных лабораториях, поскольку без использования референтных культур невозможно сравнение результатов, полученных в разных лабораториях [3]. Микробиологические коллекции предназначены для формирования и поддержания микроорганизмов в условиях, исключающих утрату их свойств, изменения морфологических, биохимических, серологических и токсических свойств или чувствительности к антибиотикам [4]. Организации, занимающиеся коллекционной деятельностью, ответственны за хранение большого разнообразия штаммов и поддержание их в жизнеспособном неизменном состоянии, что является трудоемкой задачей. Небольшую коллекцию можно поддерживать, используя традиционный метод периодического пересева на свежие питательные среды. Тем не менее применение данного подхода может способствовать накоплению генетических мутаций и, как следствие, изменению биологических свойств бактериальной клетки [5].

Коллекционная деятельность имеет важное значение при изучении возбудителей особо опасных инфекций (ООИ). В Российской Федерации (РФ) коллекции возбудителей ООИ находятся в подведомственных учреждениях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российской академии наук, Российской академии медицинских наук, Министерства обороны РФ, Министерства сельского хозяйства РФ [6].

Для сохранения обширных коллекционных фондов в коллекциях используются методы долгосрочного хранения культур [7]. В большинстве случаев в качестве оценки эффективности того или иного метода хранения микроорганизмов используют выживаемость культуры [8], а фенотипическая и тем более генетическая стабильность культур изучаются намного реже. Однако при использовании различных методов хранения штаммов были зарегистрированы изменения их гено- и фенотипов [9, 10].

В последние годы для изучения изменений генотипа микроорганизмов в коллекциях исследователи получили возможность проводить количественную оценку геномных мутаций методом полногеномного секвенирования, в том числе для разных пассажей одной коллекционной культуры. Так, в исследовании Sakurai и Kawasaki [11] изучалось накопление полиморфизмов при хранении штаммов, депонированных в биоресурсном центре Национального института технологий и оценки Японии (NBRC). Авторами был проведен анализ полногеномных полиморфизмов различных партий микроорганизмов, которые были получены из одного источника и хранились в NBRC от 4 до 38 лет, в лиофильно-высушенном состоянии при +4°C. При сравнении последовательности геномов штаммов одного происхождения, а также штаммов, полученных из других публичных коллекций, геномные различия были обнаружены у всех 24 протестированных бактериальных культур, находящихся на хранении в данной организации. Однако авторы не проводили анализ причин возникновения мутаций. С одной стороны, мутации в партиях материала, заложенных в разное время, могут накопиться при пересевах культуры между этапами длительного хранения. С другой – процедуры, сопряженные с лиофилизацией, являются сильным стрессом, способным привести к повышенной частоте возникновения мутаций [11].

В 2016 г. было показано воздействие криоконсервации на бактериальные геномы [12]. Авторы подвергли три штамма *Escherichia coli* однократному замораживанию при различных концентрациях криопротектора глицерина и различных методах замораживания. Штаммы не только демонстрировали различия в жизнеспособности в зависимости от концентрации глицерина, но и этот единственный случай замораживания, очевидно, привел к потере редких аллелей в экспериментальных популяциях. Авторы пришли к выводу, что криоконсервация сама по себе может влиять на фенотипы и генотипы популяции, и связали данные изменения с естественным отбором, а не генетическим дрейфом.

Прогресс в области технологий секвенирования ДНК нового поколения (next-generation sequencing/NGS) привел к широкому внедрению данного метода в деятельность микробиологов. На сегодняшний день эти технологии доступны для широкого спектра исследований [13]. Существует несколько доступных платформ NGS: Illumina, Ion Torrent, Pacific Biosciences, мономолекулярное нанопоровое секвенирование компании Oxford Nanopore, MGI, с использованием которых можно проводить анализ геномов бактерий. Одним из наиболее распространенных способов использования NGS для определения аутентичных свойств бактериальных штаммов является их ресеквенирование и сравнение с наиболее близким эталонным геномом для выявления существенных генетических различий между ними [14]. Данная технология применяется для выявления мутаций при хранении и культивировании коллекционных культур, вызванных воздействием стрессовых физических факторов и применения искусственных питательных сред [15]. Поскольку метаболические особенности и транскрипционные регуляторные факторы микроорганизмов оптимизированы эволюцией в ответ на селективное давление, присутствующее в естественной экологической нише каждого вида, переход к лабораторным методам поддержания культур в жизнеспособном

состоянии способен привести к возникновению субпопуляций бактериальной культуры, приспособленных к изменившимся условиям. Находясь в лабораторных условиях, микроорганизмы могут адаптироваться путем возникновения мутаций, инактивирующих гены, излишние в данной среде [16]. Показательной является работа Liu et al. (2017), посвященная анализу мутаций в геномах пяти изолятов *E. coli*, четыре из которых (GE3, MEM, PAR и WAT) были выделены из окружающей среды, а один (MG1655) являлся культурой распространенного лабораторного штамма K-12 [17]. Особенность данной работы заключалась в реконструкции полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид для каждого из бактериальных штаммов, взятых в работы по алгоритму *de novo*. Авторами были изучены скорости накопления мутаций в условиях длительного культивирования в стационарной фазе и при ежедневных пересевах изучаемых бактериальных культур. После 10 дней культивирования до 25 мутаций присутствовало во всех культурах естественных изолятов (рис. 1). Среди всех мутаций два гена были подвержены параллельным изменениям при различающемся генетическом фоне изолятов, взятых в работу. Мутации в гене *rpoS* присутствовали в изолятах, полученных от всех четырех разных предков. Помимо этого, изоляты приобрели мутации в гене *mutL*, влияющем на репарацию ДНК. Повышенная частота мутаций в этих изолятах указывает на опасность генетической нестабильности, возникающей в лабораторных условиях. Ни мутации гена *rpoS*, ни мутации гена *mutL* не были обнаружены в лабораторном штамме MG1655, однако в нем при тех же условиях культивирования все же присутствовало несколько новых мутаций.

Особый интерес представляет тот факт, что повышенная частота мутационного процесса зарегистрирована в этом эксперименте для культур, длительное время находившихся в стационарной стадии роста (LE1). Эта работа подтверждает более ранние наблюдения, согласно которым длительная инкубация в стационарной фазе в течении нескольких дней на богатых средах (и даже пересылка культур между лабо-

раториями) способна приводить к возникновению гетерогенности бактериальных популяций [18, 19].

Эффекты, связанные с лабораторными пассажами, не ограничиваются штаммами *E. coli*, а наблюдаются для разных бактерий, включая патогены [20–25]. Однако в работе Liu впервые были показаны изменения генома изучаемого микроорганизма с использованием прямого метода – реконструкции полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид [17].

Проблемы при хранении микроорганизмов

Существуют краткосрочные и долгосрочные методы консервации бактериальных штаммов. К краткосрочным методам относятся периодические пересевы на свежие питательные среды (субкультивирование), хранение под минеральным маслом, хранение в воде и водно-солевых растворах, хранение высушиванием на твердых носителях, хранение замораживанием при температурах ниже точки кристаллизации воды. К долгосрочной консервации относят замораживание при низких температурах (криоконсервация), консервацию высушиванием из замороженного состояния (лиофилизация), консервацию высушиванием из жидкого состояния (L-высушивание) [5, 26–28].

Точные механизмы, приводящие к индукции генотипических и фенотипических изменений в микробных клетках во время хранения и субкультивирования, еще не ясны и требуют дополнительных исследований. Предполагается, что несколько факторов, включая температурный шок, окислительный стресс, токсичность криопротекторов, криоповреждения, образование внутриклеточного льда, влияние вакуума и испарения жидкости при сушке и замораживании, а также образование свободных радикалов, могут вызывать различные виды генотипических и фенотипических изменений в культурах [29]. Помимо методов хранения, колебания температуры во время замораживания и оттаивания и даже перенос культур из одного морозильника в другой могут рассматриваться как факторы, вызывающие стрессовые условия для микроорганизмов.

В настоящее время не все широко распространенные методы хранения могут быть применимы для выделенных изолятов бактерий. Для некоторых бактериальных культур характерно гипермутаторное состояние – процесс ускоренного накопления мутаций, как правило, связанный с ошибками в работе бактериальных полимераз либо систем репарации ДНК. Особую проблему для деятельности микробных коллекций представляет сохранение подобных клинических изолятов в том случае, если они актуальны для изучения возбудителей инфекционных заболеваний.

Для организаций, работающих над моделированием ООИ или разработкой вакцин, критически важным является сохранение вирулентности культуры. Была исследована стабильность двух плазмид вирулентности 142 изолятов *Bacillus anthracis* после хранения на протяжении нескольких десятков лет при температуре -20°C на бруцелла-бульоне с добавлением 20% глицерина. Плазмида pXO1 содержит гены, кодирующие сибиреязвенный токсин, а плазмида pXO2 несет кластер генов, отвечающий за экспрессию капсулы. Путем фенотипической оценки с использованием стандартных микробиологических критериев и ПЦР-анализа с ис-

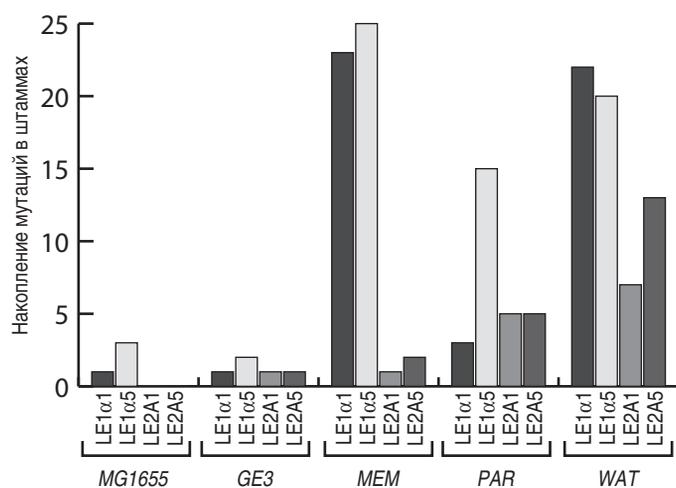


Рис. 1. Накопление мутаций в штаммах в процессе эксперимента (Liu, 2017) [17]. MG1655 – лабораторная культура штамма K-12, GE3, MEM, PAR и WAT – природные изоляты. LE1α1, LE1α5 – клоны, полученные при культивировании в стационарной фазе 10 дней без пересевов; LE2A1, LE2A5 – клоны, полученные при культивировании 10 дней при ежедневном пересеве.

пользованием праймеров, специфичных для этих плазмид, была выявлена утрата плазмиды pXO2 у 21 изолята *B. anthracis*. Изначально 35 изолятов *B. anthracis* продемонстрировали смешанный фенотип мукоидных/немучоидных колоний, 21 изолят не смог восстановить экспрессию капсулы после повторного культивирования на бикарбонатном агаре в анаэроустате [30].

В некоторых случаях обнаружить изменения в геномах изучаемых микроорганизмов не удается, несмотря на существенную разницу их свойств. Так, в нашем центре были проведены тестикулярные пассажи микробной культуры через организм морской свинки, которые позволили значительно увеличить вирулентность *Yersinia pestis* B-6706. Показатель LD₅₀ культуры для морских свинок до анимализации превышал 10⁶ КОЕ, однако после данной процедуры составил всего 68 КОЕ [31]. Проведенное двукратное полногеномное секвенирование на платформах Illumina MiSeq и Ion Torrent PGM исходной и анимализированной культур не выявило различий в геноме. Увеличение вирулентности бактериальной культуры вследствие селекции в организме морской свинки оказалось не связано с появлением спонтанных «мутантов», а вызвано изменением экспрессии генов *psaA*, *pst*, *ansB*, *YPO3636* и *YPO0412* [32].

Микробиологические исследования часто включают обмен штаммами между лабораториями и коллекционными центрами. Сохранность фенотипических и генетических свойств передаваемых штаммов важна для обеспечения воспроизводимых экспериментальных результатов. Длительно время одним из наиболее распространенных способов транспортировки микроорганизмов была культура бактерий в агаровых столбиках. Однако такой способ транспортировки коллекционных культур может приводить к генетической нестабильности, в том числе проявляющейся в накоплении мутаций в гене *rpoS* штаммов *E. coli*. В 2011 г. обнаружена высокая экспрессия продукта гена *rpoS* у культуры *E. coli* MC4100TF, трижды транспортированной между лабораториями, что было связано с инсерцией IS1 в ген *rssB*. Сигма-фактор RpoS, накапливающийся в ответ на стрессовые факторы в стационарной фазе, вступает в конкуренцию с σ^{70} – сигма-фактором «домашнего хозяйства» – за связывания РНК-полимеразы с промоторами генов. Высокая экспрессия RpoS приводит к низкой активности биосинтеза щелочной фосфатазы и плохому росту на ацетате [18].

В 2004 г. Paul et al. показали, что длительное хранение токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* на агаровых столбиках может приводить к отбору спонтанных нетоксигенных «мутантов» благодаря мутации в промоторе *toxR*. У *toxR*-«мутантов» отсутствует экспрессия генов *ToxR*-регулона, в том числе токсина холеры, вследствие чего они получают конкурентное преимущество роста перед токсигенными клетками *in vitro* [33].

Для долгосрочного хранения бактериальных культур часто используют лиофилизацию и криоконсервацию [27, 34, 35]. Выбор между методами зачастую зависит от устойчивости микроорганизма к конкретной процедуре, имеющегося оборудования, возможности соблюдения требований биологической безопасности, а также продолжительности, условий и сроков хранения.

При криоконсервации уровень метаболизма клеток снижается с понижением температуры. Так, чем ниже температура хранения и частота колебаний температуры, тем выше стабильность и шанс успешного сохранения жизнеспособной культуры. Сложности с использованием данного метода связаны с необходимостью наличия оборудования для замораживания. Температура, необходимая для сохранения культур, обычно составляет от -80 до -135°C. Для хранения культур дольше 5 лет рекомендуется хранение при сверхнизких температурах в жидком азоте (при -196°C) или его парах [36]. Системы хранения в парах жидкого азота используются для хранения в условиях, препятствующих кросс-контаминации. При использовании данных криогенных технологий необходимо специализированное оборудование, способное обеспечивать постоянство температуры хранения.

Sleight et al. провели эксперимент по изучению эволюционной адаптации микроорганизмов к режиму замораживания–оттаивания. Таким образом, оценивалось влияние стресса замораживания–оттаивания на культуры (*freeze-thaw stress*). В эксперименте рассматривались 15 популяций *E. coli* и их приспособление к 150 двухдневным циклам замораживания (без использования криопротекторов), оттаивания и роста. По результатам исследования отмечалось изменение фенотипических свойств культур, что проявлялось в изменении скорости их роста. Так, у экспериментальных групп наблюдалось сокращение лаг-фазы, то есть периода медленного роста, когда культура приспосабливается к среде. В результате дальнейших исследований авторы выяснили, что улучшение приспособляемости организмов к циклам замораживания–оттаивания было обусловлено мутациями в гене *cls* кардиолипин синтазы – фермента, отвечающего за энергетический обмен клетки, и вставкой IS150 в межгенной области *uspA-uspB*, кодирующей два универсальных стрессовых белка. Мутация гена *cls* помогает поддерживать текучесть мембран после замораживания и оттаивания, но физиологический механизм улучшения приспособленности вследствие вставки IS150 остается неизвестным [37, 38].

Для лучшей сохранности бактериальных культур при замораживании–оттаивании используют криопротекторы, например раствор глицерина [39]. В этих же целях часто используются сахара (лактоза, мальтоза и трегалоза). Они оказывают протективное воздействие на клеточные мембраны, так как связываются с мембранными белками и препятствуют их денатурации в процессе изменения температур [40–42].

Криопротекторы предупреждают действие таких повреждающих факторов, как формирование внутриклеточного льда и обезвоживание. При этом к криопротекторам предъявляются следующие требования: они должны быть хорошо растворимыми в воде и сохранять это свойство при низких температурах, а также иметь низкую токсичность, чтобы было возможно использовать их в больших концентрациях [43, 44]. Кроме того, существует практика включения в питательные среды, используемые в качестве среды для замораживания, компонентов-криопротекторов [45, 46].

Wing et al. (2020) в своем исследовании оценивали последствия замораживания и оттаивания как на фенотипиче-

ском, так и на геномном уровнях, используя популяции *Saccharomyces cerevisiae*. Анализ проводился на пяти различных популяциях дрожжей: одной рекомбинантной популяции SGRP-4X, используемой для картирования локусов количественных признаков, и четырех изогенных штаммов. Криоконсервацию проводили при -80°C в присутствии криопротектора глицерина. Проводили пять последовательных циклов замораживания и оттаивания, после чего анализировали данные полногеномного секвенирования на уровне популяции (Pool-SEQ) после однократного цикла и после пяти циклов. Рекомбинантные популяции продемонстрировали повышенную способность выживать в течение пяти циклов замораживания–оттаивания, тогда как изогенные линии не показали заметных различий в жизнеспособности в тех же условиях. Данные Pool-SEQ для исходно изогенных линий выявили некоторые потенциальные генетические последствия циклов замораживания–оттаивания в виде мутаций *de novo* в каждой из изогенных линий. Однако, учитывая, что жизнеспособность существенно не изменялась в течение повторяющихся циклов замораживания–оттаива-

ния, вероятно, эти предполагаемые мутации имеют незначительные фенотипические последствия, связанные с замораживанием и оттаиванием, или вообще не имеют их. При изучении данных по рекомбинантным популяциям было обнаружено пять примеров потенциальных полезных мутаций *de novo*, которые могут лежать в основе наблюдаемого увеличения жизнеспособности, в том числе ген *rca1*, кодирующий переносчик кадмия. Авторы отмечают, что влияние криоконсервации на эксперименты с участием популяций с небольшими или отсутствующими генетическими вариациями, вероятно, будет незначительным [47].

Сублимационная сушка, или лиофилизация, считается золотым стандартом в области хранения микроорганизмов [29]. Обычно этот процесс включает замораживание материала, а затем высушивание в условиях вакуума, при этом замороженная вода переходит в газообразное состояние и удаляется. Тем самым почти полностью устраняется активность воды, что способствует повышению стабильности и жизнеспособности живых клеток при длительном хранении и помогает продлить срок хранения образцов [27, 48]. Однако

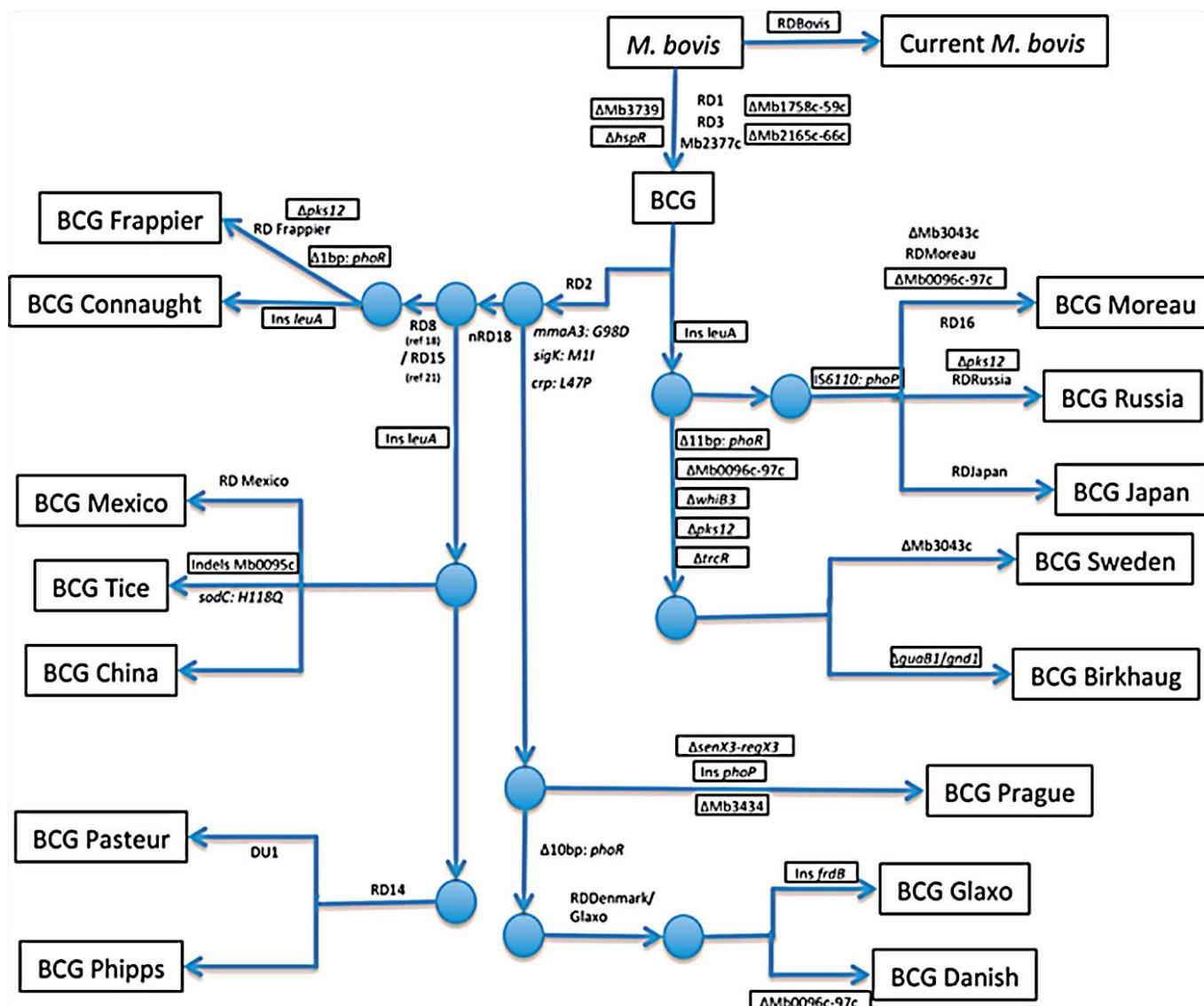


Рис. 2. Схема эволюции вакцинных штаммов БЦЖ, демонстрирующая исходный вирулентный штамм-предок *M. bovis* и последующую серию геномных изменений, включая делеции областей различия гена (regions of difference/RD), однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и некоторые штамм-специфические вставки ('Ins') и делеции ('Δ') [59].

было также показано, что процесс высушивания из замороженного состояния повреждает живые клетки, вызывая изменения свойств мембран, вторичные структурные изменения белков и разрывы цепей нуклеиновых кислот [49–52]. Повреждение, вызванное последовательными этапами замораживания, сушки и регидратации как эукариотических, так и прокариотических клеток, в основном объясняется повреждением ДНК и внутриклеточной потерей воды [53].

Dorman и Thomson секвенировали геном, изучили морфологию и фенотип лиофилизированного штамма *V. cholerae* NCTC 30, впервые выделенного в 1916 г. После 102 лет хранения была выявлена потеря подвижности у *V. cholerae* NCTC 30, а также идентифицирована мутация, из-за которой отсутствовала экспрессия генов биосинтеза жгутика [54]. Эта мутация возникла в результате сдвига рамки считывания гена *flrC*. Ген *flrC* кодирует регулятор ответа FlrC, контролирующей экспрессию генов биосинтеза жгутика класса III (жгутиковый колпачок, моторный компонент MotX и коровый флагеллин FlaA). При этом гены класса III оставались интактными у NCTC 30. Сдвиг рамки считывания препятствует синтезу последних 48 аминокислот С-конца FlrC. Поскольку эта область является ДНК-связывающим доменом регулятора ответа, то данная мутация предотвращает активацию *flrC*-генов биосинтеза жгутика класса III у *V. cholerae* NCTC 30, что вызвало отсутствие жгутика у бактерии [55].

Информация о том, как менялись фенотипы и накапливались мутации в ходе распространения исследуемого штамма при культивировании и хранении, необходима для обеспечения возможности сравнения результатов, получаемых разными научными группами в разные периоды времени. Известным примером изменения свойств бактериальных культур является ситуация с вакцинным штаммом *Mycobacterium bovis*. С момента изобретения вакцины БЦЖ (бациллы Кальметта–Герена) оригинальный штамм, хранящийся в институте Пастера, распространялся и использовался для производства субкультур и последующей вакцинации населения. Вакцина БЦЖ существует с 1921 г. и является одной из наиболее широко используемых из всех существующих в настоящее время вакцин. Вакцинация охватывает более 80% новорожденных и детей грудного возраста в странах, где она является компонентом национальной программы иммунизации детей. Ежегодно вводится более 120 млн доз БЦЖ [56]. Длительное поддержание культуры в разных коллекциях привело к накоплению генетических различий между субкультурами БЦЖ [57, 58]. За прошедшие годы выявлено более 14 субкультур БЦЖ, которые использовались в качестве штаммов вакцины БЦЖ в разных частях мира. На рис. 2 представлена генеалогия штаммов БЦЖ с обозначениями соответствующих мутаций.

В связи с этим в коллекционной деятельности необходимо выявлять генетические изменения депонированных штаммов и их влияние на свойства культуры во время долгосрочного хранения в коллекциях. Для уменьшения последствий повреждения ДНК вследствие стресса, вызванного замораживанием–оттаиванием, а также регидратацией, в клетках активируются механизмы репарации ДНК. Данный факт был установлен путем мониторинга индукции генов с использованием панели биолюминисцентных биорепортеров *E. coli*. Было показано, что гены репарации ДНК, принад-

лежащие оперону SOS, индуцировались при регидратации после лиофилизированного состояния. Это наблюдение было подтверждено УМУ-хроматом в *Salmonella typhimurium*, а также анализом ПЦР в реальном времени выбранных генов SOS *E. coli*. Результаты Rosen et al. также показывают, что весь процесс лиофилизации, а не замораживание или высушивание по отдельности, способствует индукции поврежденных ДНК [60].

Приведенные данные демонстрируют, что появление мутаций в бактериальных популяциях, культивируемых в лабораториях, являются широко распространенным явлением. Таким образом, для современной коллекционной деятельности важным условием поддержания аутентичных свойств штаммов является создание условий в лаборатории, которые будут способствовать устранению мутантных клонов, что позволит повысить стабильность сохранения исходных свойств бактериальных культур.

Заключение

В настоящее время убедительно показана возможность изменения фенотипических и генотипических свойств бактериальных культур в коллекционных фондах в результате длительного хранения и культивирования. За редким исключением исследования механизмов их возникновения проводятся на штаммах *E. coli*. При этом показано, что структура генома бактериальной культуры может оказывать значительное влияние на скорость накопления мутаций. Применяемые методы длительного хранения культур микроорганизмов сами по себе могут вызывать повреждения ДНК и приводить к накоплению мутаций в культурах, что может приводить к изменению фенотипических свойств микроорганизмов. Поскольку возникновение мутаций в геномах живых организмов представляет собой фундаментальный процесс, связанный с их эволюцией и способностью приспосабливаться к условиям окружающей среды, актуальная задача современной коллекционной деятельности фактически заключается в остановке эволюции бактериальных культур в лабораторных условиях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 1.1.18.

Financial support

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 1.1.18.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. Int J Infect Dis. 2010;14(9):e744–e751. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.12.003
2. Kocur M. History of the Král Collection. Institute for Fermentation, Osaka. 1990;2:4–12.

3. Van Hop D. Establishment and management of culture collections of microorganisms (mBRC): an overview: Conventional to Modern Approaches. 2018.55-109. DOI: 10.1007/978-3-319-96971-8_3
4. Маркин ВА. Коллекции патогенных вирусов в решении общебиологических проблем. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007;6:84-93.
5. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Осин АВ. Коллекционная деятельность в области использования патогенных микроорганизмов в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2016;1:37-46.
6. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Топорков АВ, Осин АВ. Современное состояние коллекционной деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;1(103):5-10. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-5-10
7. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006 Aug;66(2):183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
8. Сидорчук АА, Краснова АА. Сохранность культур бактерий различных групп при длительном хранении в лиофилизированном состоянии. Российский ветеринарный журнал. 2016;3:22-25.
9. Bonetto MC, Sacco NJ, Hilding Ohlsson A, Cortón E. Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* freeze-dried cultures for the design of BOD bioassays. Lett Appl Microbiol. 2012 Nov;55(5):370-5. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03302.x
10. Lang E, Malik KA. Maintenance of biodegradation capacities of aerobic bacteria during long-term preservation. Biodegradation. 1996;7:65-71. DOI: 10.1007/BF00056559
11. Sakurai K, Kawasaki H. Genetic variation during long-term preservation of bacteria in public culture collections. Int J Syst Evol Microbiol. 2018;68(5):1815-21. DOI: 10.1099/ijsem.0.002717
12. Sprouffske K, Aguilar-Rodriguez J, Wagner A. How archiving by freezing affects the genome-scale diversity of *Escherichia coli* populations. Genome Biol Evol. 2016;8(5):1290-8. DOI: 10.1093/gbe/evw054
13. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:387-402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
14. Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. Methods Mol Biol. 2014;1151:165-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-0554-6_12
15. McDonald MJ. Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. EMBO Rep. 2019;20(8):e46992. DOI: 10.15252/embr.201846992
16. Hottes AK, Freddolino PL, Khare A, Donnell ZN, Liu JC, Tavazoie S. Bacterial adaptation through loss of function. PLoS Genet. 2013;9(7):e1003617. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003617
17. Liu B, Eydallin G, Maharjan RP, Feng L, Wang L, Ferenci T. Natural *Escherichia coli* isolates rapidly acquire genetic changes upon laboratory domestication. Microbiology (Reading). 2017;163(1):22-30. DOI: 10.1099/mic.0.000405
18. Spira B, de Almeida Toledo R, Maharjan RP, Ferenci T. The uncertain consequences of transferring bacterial strains between laboratories – *rpoS* instability as an example. BMC Microbiol. 2011;8(11):248. DOI: 10.1186/1471-2180-11-248
19. Finkel SE, Kolter R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:4023-7. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4023
20. Arvand M, Schubert H, Viezens J. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. Microbes Infect. 2006;8:1315-20. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.015
21. Davidson CJ, White AP, Surette MG. Evolutionary loss of the *rdar* morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. The ISME Journal. 2008;2:293-307. DOI: 10.1038/ismej.2008.4
22. Douglas GL, Klaenhammer TR. Genomic evolution of domesticated microorganisms. Annu Rev Food Sci Technol. 2010;1:397-414. DOI: 10.1146/annurev.food.102308.124134
23. Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, et al. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002574. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002574
24. Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2003;49(3):581-90. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x
25. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, Deleo FR, Cole RL, et al. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. J Bacteriol. 2002;184(5):1430-7. DOI: 10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002
26. Smith D, Ryan MJ, Day JG. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management, Egham, UK, UKNCC Secretariat, 2001.
27. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. Appl Microbiol Biotechnol. 2012 May;94(3):565-74. DOI: 10.1007/s00253-011-3797-y
28. Overmann J, Abt B, Sikorski J. Present and Future of Culturing Bacteria. Annu Rev Microbiol. 2017 Sep 8;71:711-730. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093449
29. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiol Lett. 2013 Feb;339(1):1-9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034
30. Buyuk F, Sahin M, Cooper C, Celebi O, Saglam AG, Baillie L, et al. The effect of prolonged storage on the virulence of isolates of *Bacillus anthracis* obtained from environmental and animal sources in the Kars Region of Turkey. FEMS Microbiol Lett. 2015;362(13):1-6. DOI: 10.1093/femsle/fnv102
31. Анисимов НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, Иванов СА, Сухова МА, Дентовская СВ, Анисимов АП. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Инфекция и иммунитет. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376
32. Соломенцев ВИ, Кадникова ЛА, Кисличкина АА, Майская НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, и др. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Бактериология. 2017;2(2):30-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35
33. Paul K, Ghosh A, Sengupta N, Chowdhury R. Competitive growth advantage of nontoxic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholerae* strains. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5478-82. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5478-5482.2004
34. Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. Bull World Health Organ. 2001;79(1):43-7.
35. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. ScientificWorldJournal. 2012;2012:805659. DOI: 10.1100/2012/805659
36. Stacey GN, Day JG. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers. Methods Mol Biol. 2007;368:1-14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_1
37. Sleight SC, Lenski RE. Evolutionary adaptation to freeze-thaw-growth cycles in *Escherichia coli*. Physiol Biochem Zool. 2007 Jul-Aug;80(4):370-85. DOI: 10.1086/518013
38. Sleight SC, Orlic C, Schneider D, Lenski RE. Genetic basis of evolutionary adaptation by *Escherichia coli* to stressful cycles of freezing, thawing and growth. Genetics. 2008 Sep;180(1):431-43. DOI: 10.1534/genetics.108.091330
39. Cabrera E, Welch LC, Robinson MR, Sturgeon CM, Crow MM, Segarra VA. Cryopreservation and the Freeze-Thaw Stress Response in Yeast. Genes (Basel). 2020 Jul 22;11(8):835. DOI: 10.3390/genes11080835
40. Chin YW, Lee S, Yu HH, Yang SJ, Kim TW. Combinatorial Effects of Protective Agents on Survival Rate of the Yeast Starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. Microorganisms. 2021 Mar 16;9(3):613. DOI: 10.3390/microorganisms9030613

41. Romano N, Schebor C, Mobili P, Gómez-Zavaglia A. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res Int*. 2016 Dec;90:251-258. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.003
42. Martos GI, Minahk CJ, de Valdez GF, Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Sep;45(3):282-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x
43. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN (eds.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 2007, pp. 39-58.
44. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017 Jun;76:74-91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
45. Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, Lagier JC. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res*. 2020 Jun;236:126454. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126454
46. Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J Agric Food Chem*. 2009 Aug 12;57(15):6736-41. DOI: 10.1021/jf901044u
47. Wing KM, Phillips MA, Baker AR, Burke MK. Consequences of Cryopreservation in Diverse Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol Evol*. 2020 Aug 1;12(8):1302-1312. DOI: 10.1093/gbe/evaa121
48. Fonseca F, Cenard S, Passot S. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:477-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_24
49. Castro H, Teixeira P, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;82:87-94. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x
50. Tymczyszyn EE, del Rosario Díaz M, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal Appl Microbiol*. 2007;103(6):2410-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x
51. Tymczyszyn EE, Díaz R, Pataro A, Sandonato N, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):342-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009
52. Haindl R, Neumayr A, Frey A, Kulozik U. Impact of cultivation strategy, freeze-drying process, and storage conditions on survival, membrane integrity, and inactivation kinetics of *Bifidobacterium longum*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020 Dec;65(6):1039-1050. DOI: 10.1007/s12223-020-00815-3
53. Sharma VK, Klihanov AM. Moisture-induced aggregation of lyophilized DNA and its prevention. *Pharm Res*. 2007 Jan;24(1):168-75. DOI: 10.1007/s11095-006-9138-7
54. Dorman MJ, Thomson NR. 'Community evolution' – laboratory strains and pedigrees in the age of genomics. *Microbiology (Reading)*. 2020 Mar;166(3):233-238. DOI: 10.1099/mic.0.000869
55. Dorman MJ, Kane L, Domman D, Turnbull JD, Cormie C, Fazal MA, et al. The history, genome and biology of NCTC 30: a non-pandemic *Vibrio cholerae* isolate from World War One. *Proc Biol Sci*. 2019 Apr 10;286(1900):20182025. DOI: 10.1098/rspb.2018.2025
56. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:155-169. DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_8
57. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette–Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17827. DOI: 10.1038/srep17827
58. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals*. 2007 Apr;35(2):139-43. DOI: 10.1016/j.biologicals.2006.07.005
59. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep*. 2015 Oct 21;5:15443. DOI: 10.1038/srep15443
60. Rosen R, Buchinger S, Pfänder R, Pedhazur R, Reifferscheid G, Belkin S. SOS gene induction and possible mutagenic effects of freeze-drying in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Nov;100(21):9255-9264. DOI: 10.1007/s00253-016-7751-x

References

1. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *Int J Infect Dis*. 2010;14(9):e744-e751. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.12.003
2. Kocur M. History of the Král Collection. *Institute for Fermentation, Osaka*. 1990;2:4-12.
3. Van Hop D. Establishment and management of culture collections of microorganisms (mBRC): an overview: Conventional to Modern Approaches. 2018.55-109. DOI: 10.1007/978-3-319-96971-8_3
4. Markin VA. Collections of pathogenic viruses for addressing general biologic problems. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;6:84-93. (In Russian).
5. Onishchenko GG, Kutyrev VV, Osin AV. Collection activities in the sphere of pathogenic microorganisms usage for the provision of biological safety in the Russian Federation. *Infectious Diseases. News, Opinions, Training*. 2016;1:37-46. (In Russian).
6. Onishenko GG, Kutyrev VV, Toporkov AV, Ossin AV. Current state of collection activity relative to the use of infectious agents of I–II pathogenicity groups. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2010;1(103):5-10. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-5-10 (In Russian).
7. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*. 2006 Aug;66(2):183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
8. Sidorchuk AA, Krasnova AA. Preservation of bacterial cultures different groups after prolonged storage in a lyophilized condition. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*. 2016;3:22-25. (In Russian).
9. Bonetto MC, Sacco NJ, Hilding Ohlsson A, Cortón E. Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* freeze-dried cultures for the design of BOD bioassays. *Lett Appl Microbiol*. 2012 Nov;55(5):370-5. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03302.x
10. Lang E, Malik KA. Maintenance of biodegradation capacities of aerobic bacteria during long-term preservation. *Biodegradation*. 1996;7:65-71. DOI: 10.1007/BF00056559
11. Sakurai K, Kawasaki H. Genetic variation during long-term preservation of bacteria in public culture collections. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(5):1815-21. DOI: 10.1099/ijsem.0.002717
12. Sprouffske K, Aguilar-Rodríguez J, Wagner A. How archiving by freezing affects the genome-scale diversity of *Escherichia coli* populations. *Genome Biol Evol*. 2016;8(5):1290-8. DOI: 10.1093/gbe/evw054
13. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
14. Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol*. 2014;1151:165-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-0554-6_12
15. McDonald MJ. Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO Rep*. 2019;20(8):e46992. DOI: 10.15252/embr.201846992
16. Hottes AK, Freddolino PL, Khare A, Donnell ZN, Liu JC, Tavazoie S. Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003617. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003617

17. Liu B, Eydallin G, Maharjan RP, Feng L, Wang L, Ferenci T. Natural *Escherichia coli* isolates rapidly acquire genetic changes upon laboratory domestication. *Microbiology (Reading)*. 2017;163(1):22-30. DOI: 10.1099/mic.0.000405
18. Spira B, de Almeida Toledo R, Maharjan RP, Ferenci T. The uncertain consequences of transferring bacterial strains between laboratories – *rpoS* instability as an example. *BMC Microbiol*. 2011;8(11):248. DOI: 10.1186/1471-2180-11-248
19. Finkel SE, Kolter R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:4023-7. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4023
20. Arvand M, Schubert H, Viezens J. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. *Microbes Infect*. 2006;8:1315-20. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.015
21. Davidson CJ, White AP, Surette MG. Evolutionary loss of the *rdar* morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. *The ISME Journal*. 2008;2:293-307. DOI: 10.1038/ismej.2008.4
22. Douglas GL, Klaenhammer TR. Genomic evolution of domesticated microorganisms. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2010;1:397-414. DOI: 10.1146/annurev.food.102308.124134
23. Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, et al. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002574. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002574
24. Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2003;49(3):581-90. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x
25. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, Deleo FR, Cole RL, et al. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *J Bacteriol*. 2002;184(5):1430-7. DOI: 10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002
26. Smith D, Ryan MJ, Day JG. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management, Egham, UK, UKNCC Secretariat, 2001.
27. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 May;94(3):565-74. DOI: 10.1007/s00253-011-3797-y
28. Overmann J, Abt B, Sikorski J. Present and Future of Culturing Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2017 Sep 8;71:711-730. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093449
29. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Feb;339(1):1-9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034
30. Buyuk F, Sahin M, Cooper C, Celebi O, Saglam AG, Baillie L, et al. The effect of prolonged storage on the virulence of isolates of *Bacillus anthracis* obtained from environmental and animal sources in the Kars Region of Turkey. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362(13):1-6. DOI: 10.1093/femsle/fnv102
31. Anisimov AP, Kombarova TI, Platonov ME, Ivanov SA, Sukhova MA, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Selection of phylogenetically closely-related *Yersinia pestis* strains differing in their virulence for guinea pigs. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376 (In Russian).
32. Solomentsev VI, Kadnikova LA, Kislichkina AA, Mayskaya NV, Kombarova TI, Platonov ME, et al. Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, different by virulence for guinea pigs. *Bacteriology*. 2017;2(2):30-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35 (In Russian).
33. Paul K, Ghosh A, Sengupta N, Chowdhury R. Competitive growth advantage of nontoxicogenic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholerae* strains. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5478-82. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5478-5482.2004
34. Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ*. 2001;79(1):43-7.
35. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:805659. DOI: 10.1100/2012/805659
36. Stacey GN, Day JG. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers. *Methods Mol Biol*. 2007;368:1-14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_1
37. Sleight SC, Lenski RE. Evolutionary adaptation to freeze-thaw-growth cycles in *Escherichia coli*. *Physiol Biochem Zool*. 2007 Jul-Aug;80(4):370-85. DOI: 10.1086/518013
38. Sleight SC, Orlic C, Schneider D, Lenski RE. Genetic basis of evolutionary adaptation by *Escherichia coli* to stressful cycles of freezing, thawing and growth. *Genetics*. 2008 Sep;180(1):431-43. DOI: 10.1534/genetics.108.091330
39. Cabrera E, Welch LC, Robinson MR, Sturgeon CM, Crow MM, Segarra VA. Cryopreservation and the Freeze-Thaw Stress Response in Yeast. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 22;11(8):835. DOI: 10.3390/genes11080835
40. Chin YW, Lee S, Yu HH, Yang SJ, Kim TW. Combinatorial Effects of Protective Agents on Survival Rate of the Yeast Starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. *Microorganisms*. 2021 Mar 16;9(3):613. DOI: 10.3390/microorganisms9030613
41. Romano N, Schebor C, Mobili P, Gómez-Zavaglia A. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res Int*. 2016 Dec;90:251-258. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.003
42. Martos GI, Minahk CJ, de Valdez GF, Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Sep;45(3):282-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x
43. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN (eds.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 2007, pp. 39-58.
44. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017 Jun;76:74-91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
45. Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, Lagier JC. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res*. 2020 Jun;236:126454. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126454
46. Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J Agric Food Chem*. 2009 Aug 12;57(15):6736-41. DOI: 10.1021/jf901044u
47. Wing KM, Phillips MA, Baker AR, Burke MK. Consequences of Cryopreservation in Diverse Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol Evol*. 2020 Aug 1;12(8):1302-1312. DOI: 10.1093/gbe/evaa121
48. Fonseca F, Cenard S, Passot S. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:477-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_24
49. Castro H, Teixeira P, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;82:87-94. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x
50. Tymczyszyn EE, del Rosario Díaz M, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal Appl Microbiol*. 2007;103(6):2410-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x
51. Tymczyszyn EE, Díaz R, Pataro A, Sandonato N, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):342-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009
52. Haindl R, Neumayr A, Frey A, Kulozik U. Impact of cultivation strategy, freeze-drying process, and storage conditions on survival, membrane integrity, and inactivation kinetics of *Bifidobacterium longum*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020 Dec;65(6):1039-1050. DOI: 10.1007/s12223-020-00815-3
53. Sharma VK, Klibanov AM. Moisture-induced aggregation of lyophilized DNA and its prevention. *Pharm Res*. 2007 Jan;24(1):168-75. DOI: 10.1007/s11095-006-9138-7

54. Dorman MJ, Thomson NR. 'Community evolution' – laboratory strains and pedigrees in the age of genomics. *Microbiology (Reading)*. 2020 Mar;166(3):233-238. DOI: 10.1099/mic.0.000869
55. Dorman MJ, Kane L, Domman D, Turnbull JD, Cormie C, Fazal MA, et al. The history, genome and biology of NCTC 30: a non-pandemic *Vibrio cholerae* isolate from World War One. *Proc Biol Sci*. 2019 Apr 10;286(1900):20182025. DOI: 10.1098/rspb.2018.2025
56. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:155-169. DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_8
57. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette–Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17827. DOI: 10.1038/srep17827
58. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals*. 2007 Apr;35(2):139-43. DOI: 10.1016/j.biologicals.2006.07.005
59. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep*. 2015 Oct 21;5:15443. DOI: 10.1038/srep15443
60. Rosen R, Buchinger S, Pfänder R, Pedhazur R, Reifferscheid G, Belkin S. SOS gene induction and possible mutagenic effects of freeze-drying in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Nov;100(21):9255-9264. DOI: 10.1007/s00253-016-7751-x

Информация об авторах:

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур 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) 31-1919

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур 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) 36-0000
E-mail: bogun@obolensk.org

Information about authors:

Anastasia Y. Lebedeva, Junior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1919

Aleksandr G. Bogun PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: bogun@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Новое исследование обнаружило прямую и специфичную для пола связь между составом микробиома младенца и поведенческим здоровьем в раннем детстве

Предыдущие исследования установили связь между микробиомом кишечника и поведением, таким как депрессия, тревожность и синдром дефицита внимания с гиперактивностью. Но до сих пор практически не было данных о людях, на основе которых можно было бы охарактеризовать роль микробиома в младенчестве в отношении этих результатов у детей и того, как они могут различаться у мальчиков и девочек. Чтобы определить, связаны ли различия в микробиоме младенца с нейроповедением и различается ли это поведение у мальчиков и девочек, исследовательская группа использовала когортное исследование новорожденных. Исследователи проанализировали образцы стула у 260 младенцев в разные моменты времени – шесть недель, один год и два года. Это позволило им охарактеризовать виды микробов, присутствующих в кишечнике каждого участника, и их функции. Затем они использовали систему оценки поведения для детей. Установлено, что изменения микробиома происходят раньше, чем изменения в поведении. Обнаружено, что микробиомы младенцев и детей раннего возраста были связаны с нейроповеденческими структурами, такими как тревога, депрессия, гиперактивность и социальное поведение, в зависимости от времени и пола. Например, обнаружили, что увеличение разнообразия кишечника было лучше для мальчиков, а это означает, что оно было связано с меньшим количеством форм поведения, таких как тревога и депрессия, но не среди девочек. Установлены различия в социальном поведении с микробиомами, измеренными на более поздних стадиях, где были доказательства того, что разнообразие, опять же, может быть полезным для мальчиков, но не для девочек.

Хотя результаты не позволяют идентифицировать виды микробов, которые можно использовать для предотвращения развития у детей нейроповедения, такого как тревога или депрессия, полагают, что они послужат информацией для будущих исследований, которые помогут более глубоко изучить некоторые из полученных результатов.

Laue HE, Karagas MR, Coker MO, Bellinger DC, Baker ER, Korrick SA, Madan JC. Sex-specific relationships of the infant microbiome and early-childhood behavioral outcomes. *Pediatr Res*. 2021 Nov 4. DOI: 10.1038/s41390-021-01785-z.



Меджидов Магомед Меджидович

1 сентября 2021 г. на 86-м году жизни скончался известный микробиолог, профессор, бывший генеральный директор НПО «Питательные среды» Минздрава России Меджидов Магомед Меджидович.

М.М.Меджидов родился в с. Батлаич Республики Дагестан в 1935 г. В 1961 г. после учебы в Дагестанском мединституте поступил в аспирантуру Саратовского медицинского института, в 1964 г. защитил кандидатскую диссертацию. В начале 1970-х гг. заведовал центральной лабораторией в Алжире. Затем длительное время работал в Дагестанской государственной медицинской академии, начиная с должности ассистента и заканчивая заведующим кафедрой микробиологии. В 1987 г. Магомед Меджидович защитил докторскую диссертацию по теме «Разработка и производство микробиологических питательных сред на основе непищевого сырья». Обширный список научных и практических трудов профессора Меджидова включает 4 монографии, 106 научных работ, 7 методических рекомендаций, 11 изобретений, 35 нормативно-технических документов.

Научно-общественная деятельность М.М.Меджидова отмечена званиями члена-корреспондента РАЕН, академика Российской академии медико-технических наук, заслуженного деятеля науки ДАССР, Отличника здравоохранения.

С 1980 по 2002 г. М.М.Меджидов бессменно работал директором филиала АО НПО «Микроген» в г. Махачкала НПО «Питательные среды». В самые трудные годы он был у руля предприятия, спасая его от банкротства, закрытия и рейдерских захватов. Предприятие под его руководством процветало. Вырастил и воспитал двух прекрасных детей – доктора и кандидата медицинских наук.

Редакционная коллегия журнала «Бактериология», коллеги из Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии искренне соболезнуют семье, друзьям и коллективу НПО «Питательные среды», где много лет проработал профессор Меджидов М.М.

Мы скорбим вместе с вами!



Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур

Список услуг, предоставляемых ГКПМ-Оболенск

ГКПМ-Оболенск



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

Коллекция оказывает услуги:

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

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

Подразделение, ответственное за осуществление деятельности

ГКПМ-Оболенск – отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ

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

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

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

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



Уважаемые коллеги!

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

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

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

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

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

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

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

Контактная информация:

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

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

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование



Правила оформления статей

(основные положения)

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

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

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

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

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

Требования к оформлению статьи.

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

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

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:
142279, Московская обл.,
Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ
Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10
E-mail: info@obolensk.org
или
bacteriology@obolensk.org