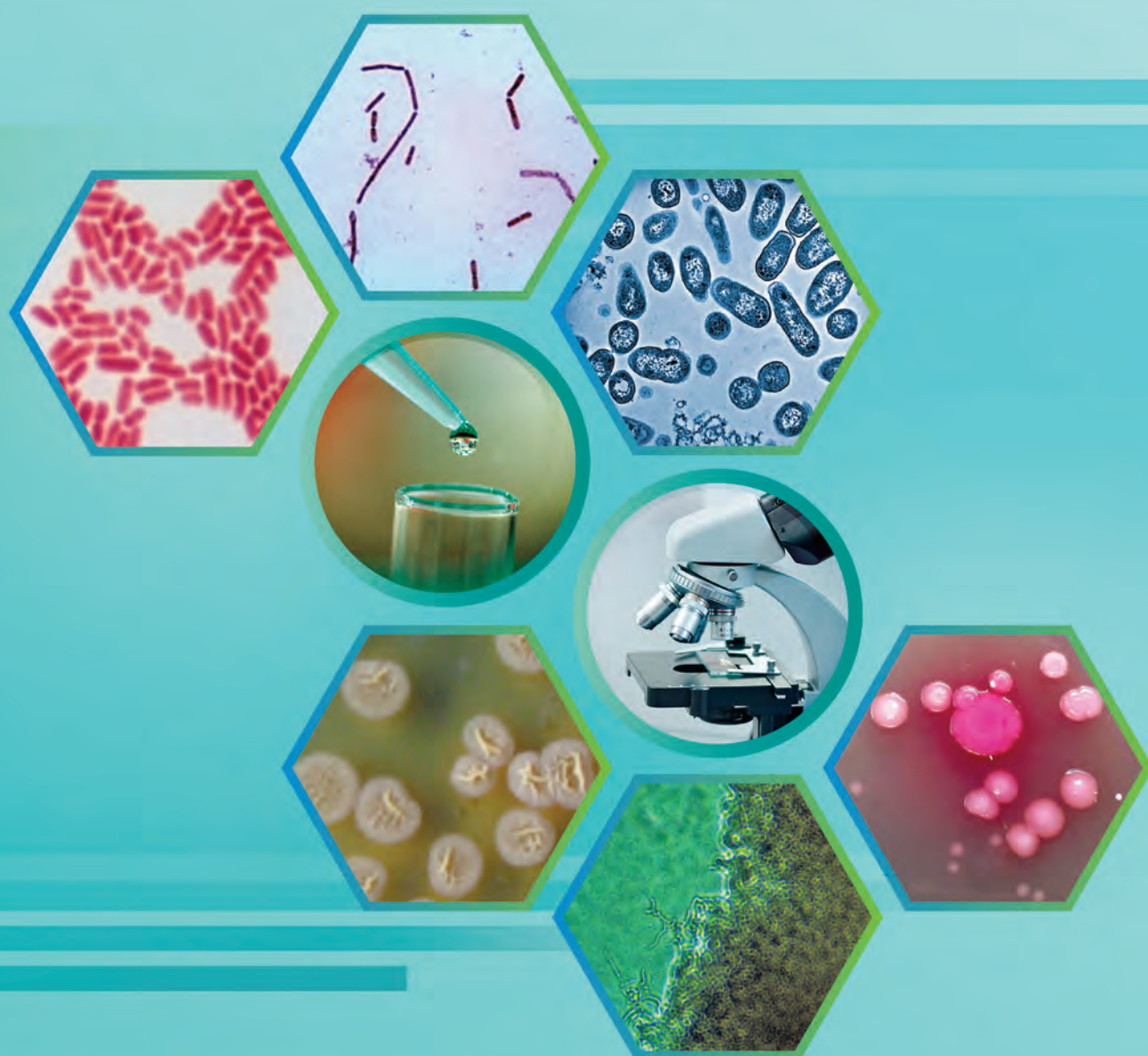


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2022 • том 7 • №2

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

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

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

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

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, ул. Азовская, д. 6, корп. 3

Подписано в печать 30.06.2022 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

- Современные технологические платформы для разработки вакцин
против опасных бактериальных инфекций (часть I) **5**

Экспериментальные статьи

- Мышиная модель летального листериоза для оценки эффективности антибактериальных препаратов
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина **8**
- Использование молекулярного метода для идентификации возбудителя паратифа В
Л.А.Кафтырева, С.А.Егорова, О.А.Каменева, К.Г.Косякова, А.О.Шапарь, Р.В.Кицбашвили, Н.С.Каменева **22**
- Сравнительная оценка питательных сред для выделения сальмонелл из кормов для животных
А.А.Кремлева, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин **28**
- Определение эффективности алгоритмов библиотеки машинного обучения PyCaret
для видовой идентификации микроорганизмов на основании данных времяпролетной масс-спектрометрии
М.Д.Хамитова, К.В.Детушев, А.Г.Богун **34**
- Распространение и биологические свойства стафилококков,
выделенных от медицинского персонала хирургических клиник
Н.И.Мамарасулова **39**
- Изменения комплементарной активности сыворотки крови у детей,
больных острой дизентерией в сочетании с глистной инвазией
Г.М.Одилова, М.И.Юсупов **42**
- Сравнительная характеристика коагулазонегативных стафилококков,
выделенных от больных с различными поражениями кожи и от здоровых людей
М.И.Юсупов **45**
- Клиническая картина детской скарлатины в Узбекистане
С.А.Низамова, Б.М.Таджиев **47**

Обзорные статьи

- Clostridioides difficile* – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита
Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова **50**
- Обнаружение энтерококков в воде: что изменилось после введения СанПиН 1.2-3685-21
Л.В.Домотенко, Т.П.Морозова, А.П.Шепелин **64**
- Роль клеток-персистеров в организме человека
А.Б.Хайтович, А.А.Грищенко **72**
- Правила оформления статей (основные положения) **78**

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

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

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Editorial Office:

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

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

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

Editor-in-Chief's Introduction

Modern technological platforms for the development of vaccines against dangerous bacterial infections (Part I)	5
--	---

Experimental Articles

A mouse model of lethal listeria for assessing the efficiency of antibacterial drugs <i>A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina</i>	8
Using the molecular method for identification of the pathatitus B pathogus <i>L.A.Kaftyreva, S.A.Egorova, O.A.Kameneva, K.G.Kosyakova, A.O.Shapar, R.V.Kitsbabashvili, N.S.Kameneva</i>	22
Comparative evaluation of nutrient media for the isolation of <i>Salmonella</i> from animal feed <i>A.A.Kremleva, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin</i>	28
Determining the effectiveness of the algorithms of the PyCaret machine learning library for species identification of microorganisms based on time-of-flight mass spectrometry data <i>M.D.Khamitova, K.V.Detushev, A.G.Bogun</i>	34
Distribution and biological properties staphylococci isolated from medical staff of surgical clinics <i>N.I.Mamarasulova</i>	39
Changes in the complementary activity of the blood serum in children with acute dysentery in combination with helminthic invasion <i>G.M.Odilova, M.I.Yusupov</i>	42
Comparative characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with various skin lesions and from healthy people <i>M.I.Yusupov</i>	45
Clinical picture of children` scarlet fever in Uzbekistan <i>S.A.Nizamova, B.M.Tadjiyev</i>	47

Review Articles

<i>Clostridioides difficile</i> is the causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis <i>B.V.Eruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova</i>	50
Detection of enterococci in water: what has changed after the introduction of SanPiN 1.2-3685-21 <i>L.V.Domotenko, T.P.Morozova, A.P.Shepelin</i>	64
The role of persister cells in the human body <i>A.B.Khaitovich, A.A.Grishchenko</i>	72
Instructions for Authors	78

Современные технологические платформы для разработки вакцин против опасных бактериальных инфекций (часть I)

Среди патогенных бактерий наибольшую опасность в отношении проявления из природных очагов инфекций, в результате террористических или военных действий представляют нозологические формы, относящиеся к I–II группам патогенности по национальной классификации. Из возбудителей, вызывающих лихорадочные заболевания, это чума, сибирская язва, туляремия, бруцеллез, сап и мелиоидоз, из вызывающих кишечные проявления – холера, энтерогемморагические эшерихиозы, возбудитель брюшного тифа (хотя он и из III группы).



Данные инфекции хорошо поддаются лечению современными антибиотиками, если штаммы произошли из природных источников. Однако новые генно-инженерные технологии позволяют в короткие сроки (2–3 нед.) создать штаммы возбудителей с множественной устойчивостью к антибактериальным лекарственным препаратам. Начали появляться и природные штаммы с повышенным спектром устойчивости.

В этой связи особое значение приобретает вакцинопрофилактика инфекций, причем в таком виде, чтобы вакцинному процессу не мешало превентивное предэкспозиционное введение антибиотиков контингентам, которые могут подвергнуться заражению. Использование живых вакцин в такой ситуации малоэффективно.

Для подобных целей в мире разрабатываются рекомбинантные субъединичные вакцины, которые можно применять независимо от процесса неспецифической профилактики.

Формирование собственных научных тематик России в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности 2009–2014, 2015–2020 гг.», Госпрограммы «Обеспечение химической и биологической безопасности в Российской Федерации 2020–2024 гг.», «ФНТП по развитию генетических технологий на 2019–2024 годы», Федерального проекта «Санитарный щит страны» позволило возобновить работы в данной области, что уже привело к существенным результатам по созданию средств иммунопрофилактики опасных инфекций.

В результате выполнения данных работ была сформирована концепция, направленная на создание вакцинных препаратов нового поколения в минимально короткие сроки. Для этих целей разрабатывается ряд технологических платформ, которые для бактериальных инфекций распределены по четырем направлениям: 1) «Субъединичные рекомбинантные вакцины», 2) «Вакцины на основе бактериальных полисахаридов», 3) «Вакцины на основе бактериальных теней», 4) «Вакцины на основе аттенуированных штаммов возбудителя туляремии».

Технически вся линейка создания вакцин укладывается в следующую схему. Создание коллекций и базы генетических конструкций и продуцентов, обеспечивающих быстрое развертывание работ по разработке вакцин к новому распространяемому возбудителю. Как правило, все детерминанты вирулентности патогенов известны и появление новых маловероятно. Наиболее вероятно создание или естественное появление штаммов с несколькими известными детерминантами из разных групп патогенов. Выявление и анализ новых патогенов предполагает в дальнейшем использование коллекций конструкций и штаммов для реализации лабораторного этапа исследований, пилотных испытаний биотехнологической схемы получения компонентов вакцины и конечного препарата. Назрела необходимость разработать схему ускоренных доклинических и клинических испытаний с минимизацией бюрократической составляющей.

Немаловажным является вопрос о создании резервных биотехнологических производств с возможностью масштабирования процессов изготовления актуальной вакцины.

В мире также уделяется значительное внимание созданию средств купирования токсических состояний при воздействии на организм человека биологических токсинов. Из них наиболее значимыми для биологической безопасности являются ботулотоксин, холерный токсин, рицин, группа стафилококковых токсинов, эшерихиозный токсин второго типа, а также летальные токсины морского происхождения, которые в настоящее время легко могут быть клонированы и созданы эффективные их продуценты.

Для этих целей разрабатываются специфические человеческие моноклональные антитела (МКА), способные нейтрализовать токсины без развития сильных гетерологичных иммунных реакций. Технология, развиваемая в России, основана на использовании генетического материала специфических плазмобластов с последующим созданием продуцентов человеческих МКА к каждому токсину. При доведении данной технологии до получения биотехнологически значимых продуцентов она может быть тиражирована на любые другие токсины, что обеспечит технологическую независимость страны в данной сфере.

Для эффективной реализации направления по созданию рекомбинантных вакцин против бактериальных особо опасных инфекций и человеческих МКА против биотоксинов в рамках Федерального проекта «Санитарный щит страны» предусмотрено строительство и реконструкция зданий под соответствующие производства.

Технологическая платформа – это саморегулируемое сетевое объединение передовых научных организаций, лидирующих в отрасли производственных компаний, авторитетных некоммерческих организаций. Участником технологической платформы может выступать и государство в лице своих представителей. Технологические платформы образуются для решения стратегических задач научно-технологического развития и рассматриваются как один из механизмов развития приоритетных научно-технологических направлений.

Для вакцинной платформы базовый носитель является основой для сборки модульной вакцины (микрокапсулы, векторные микроорганизмы, бактериальные тени, везикулы внешних мембран и т.п.). Антигенными модулями являются охарактеризованные и стандартизованные протективные антигены патогенных бактерий и технологии их быстрой наработки для включения в состав модульных вакцин. Модульные (платформенные) вакцины состоят из базового носителя (платформы), на основе которого конструируется вакцина, включающая отдельные антигены (модули), стандартизованные для возможности универсального соединения с базовым носителем и друг с другом.

Вакцинация продолжает оставаться ведущей стратегией защиты от инфекционных патогенов. Традиционные вакцины, в которых для повышения иммунного ответа используются цельноклеточные антигены, оказались неопровержимо успешными в контроле или локальной ликвидации таких заболеваний, как полиомиелит, корь, эпидемический паротит, краснуха, грипп и гепатиты А и В. Ликвидация оспы была объявлена в 1980 г. после глобальных усилий СССР и Всемирной организации здравоохранения по иммунизации. Чума крупного рогатого скота была вторым заболеванием, ликвидированным в глобальном масштабе с помощью традиционных средств вакцинации, как было объявлено Всемирной организацией здравоохранения животных в 2011 г. Несмотря на этот успех, живые аттенуированные и инактивированные вакцины обладают рядом серьезных недостатков, одним из которых является длительность их разработки, проверки и получения регистрационного удостоверения. Длительность разработки и производства вакцин зависит от многих факторов: штамма возбудителя, антигенных свойств, степени изученности. В среднем этапы занимают следующее количество времени: базовые исследования – 2–4 года; доклинические испытания – до 2 лет; первая фаза клинического этапа – 1–5 лет; вторая фаза – 2–3 года; третья – 5 и более лет.

Суммарно на разработку одной вакцины уходит примерно 10–15 лет без учета мониторинга после внедрения в производство. В ряде случаев допускается экстренный выпуск препаратов. Однако это не означает, что они «не проверены». В любом случае вакцина проходит установленные протоколом этапы, но в очень сокращенном варианте. В качестве примера можно привести COVID-19 или вакцину против вируса Эбола. То же происходит, если свойства, присущие семейству возбудителя, хорошо известны. Например, ежегодные мутации вируса гриппа не являются препятствием для быстрого производства новой вакцины.

Для ускорения этих процессов предложена технология модульных вакцин (вакцинных платформ). Технология опирается на предварительно создаваемый «конструктор», включающий базовые носители (платформы) на основе прототипов уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие таких заранее приготовленных «конструкторов», чьи базовые носители и

модульные антигены успешно прошли фазу II клинических испытаний, может решить такие проблемы производства вакцин, как скорость разворачивания масштабного выпуска.

Помимо включения в банк прототипов уже известных патогенов и их протективных антигенов необходимо проводить целенаправленный поиск потенциальных возбудителей, вызывающих эпидемии и пандемии. Продолжающаяся пандемия COVID-19 продемонстрировала важность быстрой разработки вакцин. Комплексный подход к исследованиям и разработкам вакцин максимизирует биомедицинскую готовность к пандемиям за счет использования гибких модульных вакцин на основе прототипов патогенов, универсальных для целых групп родственных патогенных бактерий. Даже если взятые по отдельности компоненты «конструктора» обладают высокой токсичностью, слабой иммуногенностью и плохой стабильностью, редактирование геномов штаммов продуцентов позволяет устранить эти недостатки. Однако эти прикладные исследования по редактированию геномов должны опираться на фундаментальные и поисковые исследования для определения подходящих модулей с потенциалом протективных антигенов. Использование универсальных платформ способствует упорядоченной и стандартизированной разработке вакцин, потенциально снижая затраты на весь цикл получения конечного продукта.

На основе анализа современных научных достижений в области вакцинологии может быть предложен алгоритм ускоренной разработки и выпуска бактериальных модульных вакцин против эмерджентных бактериальных инфекций с пандемическим потенциалом, включающий 8 этапов:

- мониторинг современных научных разработок бактериальных вакцин;
- предварительное создание и последующее пополнение банка унифицированных модульных протективных антигенов бактериальных патогенов и вакцинных платформ (базовых носителей);
- определение оптимального набора биомоделей (видов, пород, линий) для оценки антигенных модулей и базовых вакцинных платформ, потенциально протективных для людей;
- получение регистрационных удостоверений на фармацевтические субстанции (модульные протективные антигены и базовые вакцинные платформы) и лекарственные препараты для медицинского применения (вакцины);
- индикация, идентификация, полногеномный сиквенс, аннотация генома и определение *in silico* генов, кодирующих поверхностно расположенные антигены – потенциальные факторы патогенности;
- доклиническая оценка безвредности и протективности вновь выявленных индивидуальных антигенов, антигенных композиций и антигенов, презентованных на базовых вакцинных платформах;
- проведение I и II фаз клинических испытаний;
- регистрация.

При создании банка продуцентов унифицированных протективных антигенов патогенных бактерий предпочтительно использовать следующие методы: обратная вакцинология и поиск гомологичных генов в GenBank'e; молекулярное клонирование и синтез целевых генов; удаление последовательностей, ответственных за токсичность, иммуносупрессию и аллергизацию; оптимизация аминокислотных последовательностей; получение полиэпитопных иммуногенов и слитных белков; оптимизация технологии наработки и очистки компонентов; определение протективности для различных групп животных, включая приматов.

Охарактеризованные целевые продукты (гены или белки) будут совместимы со всеми платформами бактериальных вакцин.

Предпочтение при депонировании в банке будет отдано антигенам с индексами иммунитета ≥ 10 . Что касается предпочтительности наработки вакцинного препарата сразу в виде поликомпонентного варианта или в виде отдельных модулей, объединяемых перед использованием, то, как свидетельствует сравнительная оценка, оба варианта обладают сравнимой эффективностью. Модульные компоненты целесообразнее выделять и чистить отдельно, так как это позволит увеличить выход целевых продуктов.

Описание конкретных, разрабатываемых нами платформ – в следующем номере журнала «Бактериология».

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

Мышиная модель летального листериоза для оценки эффективности антибактериальных препаратов

А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина

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

Listeria monocytogenes – микроорганизм, вызывающий в основном пищевую инфекцию у человека, которая часто заканчивается смертью. Важным свойством листерий является их способность проникать из кишечника в различные органы и ткани макроорганизма, а также преодолевать гематоэнцефалический и плацентарный барьеры. Нередко эффективные *in vitro* против *L. monocytogenes* антибиотики и рекомендованные схемы их применения не дают желаемого лечебного эффекта. Поиск новых антибактериальных препаратов и схем лечения листериоза невозможно проводить без использования животных моделей листериозной инфекции, которые дают объективные данные об их эффективности *in vivo*.

В ходе наших исследований была разработана модель генерализованной листериозной инфекции у мышей линии BALB/c, характеризующаяся 100%-й гибелью животных. Листериозный сепсис вызывали путем внутрибрюшинного введения культур вирулентных (клинических) штаммов *L. monocytogenes* – MA554, BB1 или YIM3. В процессе изучения экспериментального листериоза были определены оптимальные заражающие дозы *L. monocytogenes*, динамика диссеминации клеток патогена в организме мышей, патологические и функциональные изменения в органах и тканях. Пригодность разработанной модели листериозной инфекции у мышей была проверена в экспериментах по лечению. В качестве антибактериальных препаратов использовали ко-тримоксазол и комбинацию ампициллина с гентамицином. Показано, что антибиотикотерапия летального листериоза, начатая в различные периоды генерализации инфекции, защищает мышей от гибели и saniрует их организм от возбудителя инфекции – *L. monocytogenes*, что говорит о пригодности разработанной нами модели. Более позднее начало лечения дает менее выраженный терапевтический эффект

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, мышиная модель, листериоз, сепсис, антибиотикотерапия

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. Мышиная модель летального листериоза для оценки эффективности антибактериальных препаратов. Бактериология. 2022; 7(2): 8–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-8-21

A mouse model of lethal listeria for assessing the efficiency of antibacterial drugs

A.I.Borzhilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina

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

Listeria monocytogenes is a microorganism that causes mainly a foodborne infection in humans, which often results in death. An important property of *Listeria* is their ability to penetrate from the intestine into various organs and tissues of the macroorganism, as well as to overcome the blood-brain and placental barriers. Quite often, antibiotics effective against *L. monocytogenes in vitro* and the recommended regimens for their use do not provide the desired therapeutic effect. The search for new antibacterial drugs and treatment regimens for listeriosis cannot be carried out without the use of animal models of listeriosis infection, which provide objective data on their effectiveness *in vivo*.

In our research, a model of generalized listeriosis infection in BALB/c mice was developed, which is characterized by 100% death of animals. Listeriosis sepsis was induced by intraperitoneal injection of cultures of virulent (clinical) strains of *L. monocytogenes* – MA554, BB1 or YIM3. The optimal infecting doses of *L. monocytogenes*, the dynamics of dissemination of pathogen cells in mice, pathological and functional changes in organs and tissues have been determined in the process of experimental listeriosis studying. The suitability of the developed model of listeria infection in mice has been tested in treatment experiments. Co-trimoxazole and a combination of ampicillin with gentamicin has been used as antibacterial drugs. It has been

Для корреспонденции

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

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: borzhilov@obolensk.org

Статья поступила 11.04.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Alexander I. Borzhilov, MD, PhD, Leading Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: borzhilov@obolensk.org

The article was received 11.04.2022, accepted for publication 30.06.2022

shown that antibiotic therapy for lethal listeriosis, started at different periods of infection generalization, protects mice from death and sanitizes their body from the infectious agent, *L. monocytogenes*, which indicates the suitability of our model. A later start of treatment gives a less pronounced therapeutic effect.

Key words: *Listeria monocytogenes*, mouse model, listeriosis, sepsis, antibiotic therapy

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A. A mouse model of lethal listeria for assessing the efficiency of antibacterial drugs. *Bacteriology*. 2022; 7(1): 8–21. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-8-21

Грамположительные бактерии *Listeria monocytogenes* являются возбудителями листериоза – смертельно опасной для человека пищевой инфекции. Листерии широко распространены в природе и вегетируют в почве [1]. К роду *Listeria* относятся 17 видов, из которых только один (*L. monocytogenes*) является патогенным для человека. Люди чаще всего заражаются через продукты питания: мясные полуфабрикаты, колбасы, сырые молочные продукты, копченую рыбу [2, 3]. По количеству выявленных случаев листериоз значительно уступает сальмонеллезу и кампилобактериозу, но превосходит их по летальности и тяжести клинического течения [4, 5]. Являясь факультативным внутриклеточным патогеном, листерии способны к инвазии из кишечника внутрь организма человека, поражая различные системы и органы. Так, например, клетки *L. monocytogenes* способны преодолевать плацентарный и гематоэнцефалический барьеры, что приводит к инфекциям плода, менингиту или энцефалиту [6, 7].

Важно, что в кишечнике листерии способны формировать биопленки, позволяющие клеткам патогена длительное время персистировать в его просвете [8]. Кишечная нормофлора обеспечивает устойчивость к колонизации против многих патогенов, а опосредованное антибиотиками истощение микробиоты снижает иммунную защиту слизистых оболочек и системную иммунную защиту [9, 10]. Бактерии-продуценты бактериоцинов, такие как лактобактерии кишечной микрофлоры, способны ингибировать *L. monocytogenes* [11–13]. Лечение антибиотиками вызывает дисбиоз кишечника, подвергая хозяина заражению даже при очень низких дозах *L. monocytogenes* [14]. Более высокий уровень заболеваемости наблюдается в случае иммунодефицитных состояний [15, 16], у детей и пожилых людей [17, 18], у беременных женщин [19]. Смертность среди людей, заболевших листериозом, может достигать 30% [6, 20].

Способность листерий к внутриклеточной и внеклеточной персистенции в сочетании с природной устойчивостью к некоторым антибиотикам значительно затрудняет антибиотикотерапию листериоза и ухудшает прогноз лечения [21–23].

Подавляющее большинство штаммов *L. monocytogenes* чувствительны к действию β-лактамовых антибиотиков пенициллинового ряда, аминогликозидов, тетрациклинов, гликопептидов, фторхинолонов последнего поколения, макролидов, карбапенемов, триметоприм/сульфаметоксазола, но устойчивы к цефалоспорином и гентамицину [24–27]. Имеются сведения о том, что количество полирезистентных штаммов листерий, устойчивых к трем и более антибиотикам, не превышает 23% [26].

Традиционные схемы антибиотикотерапии листериоза включают использование пенициллина и ампициллина отдельно или в комбинации с гентамицином [28, 29]. Синергизм

этих препаратов показан в экспериментах *in vitro* [30, 31]. С другой стороны, руководства по эмпирическому лечению рекомендуют использовать антибиотики широкого спектра действия, такие как пиперациллин/тазобактам или карбапенемы. Эти антибиотики также активны против *L. monocytogenes* как *in vitro*, так и *in vivo* [32–34]. Несмотря на эффективность в экспериментах, эти препараты не дают хороших результатов при лечении листериоза у людей [35]. Следует отметить, что некоторые антибиотики, активные в отношении планктонной культуры *L. monocytogenes*, оказываются неэффективными в отношении внутриклеточно персистирующих бактерий [34].

В Российской Федерации при локализованной (железистой) форме листериоза используется один из следующих препаратов: ампициллин (амоксиклав), ко-тримоксазол, эритромицин, доксициклин, левомицетин в средних терапевтических дозах или пенициллин в больших дозах. При генерализованных формах заболевания и инфекции новорожденных рекомендуется сочетание ампициллина или амоксициллина с гентамицином, а также ко-тримоксазол [36, 37].

Для поиска новых противолистерийных препаратов, эффективных комбинаций антибиотиков и схем их применения используют исследования *in vivo*, которые, в отличие от экспериментов *in vitro*, дают более достоверную информацию об эффективности антибактериальных препаратов.

Мышиная модель из-за небольшого размера грызунов и их относительной дешевизны делает возможными крупномасштабные эксперименты. Внутривенное инфицирование приводит к гибели мышей, подкожное – к сублетальной инфекции, внутрижелудочное – к кишечной инфекции, но при большой заражающей дозе. Так, например, для воспроизведения нелетальной пищевой листериозной инфекции мышам заражают внутрижелудочно культурой *L. monocytogenes* в дозе 10^8 – 10^{10} КОЕ [38]. Инфицирующая способность штаммов листерий зависит от иммунного статуса модельных животных. Установлено, что заражающая доза штамма *L. monocytogenes* F5817 (серотип 4b) при внутрижелудочном введении иммунокомпетентным мышам линии C57Bl/6j приблизительно на четыре порядка выше, чем для тех же мышам с индуцированным иммунодефицитом [39].

Различные линии мышам отличаются по восприимчивости к *L. monocytogenes*-инфекции. Мыши линии A/J, BALB/c, Ву/J значительно более чувствительны к кишечной листериозной инфекции, чем мыши C57Bl/6. Экспериментальные данные показали, что LD₅₀ *L. monocytogenes* Scott A (серотип 4b) составляет 10^6 КОЕ при внутрижелудочном введении, а для мышам C57Bl/6 – 10^8 КОЕ. Различия в составе микробиоты кишечника, способной повлиять на восприимчивость к инфекции, у этих линий мышам отсутствовали [40, 41]. Модель внутрибрюшинного заражения используют для опре-

деления вирулентности культур *L. monocytogenes* на мышах линии BALB/c весом 14–16 г [42].

В наших исследованиях мы разработали модель летальной листериозной инфекции у мышей линии BALB/c. В качестве возбудителя инфекции использовали клинические штаммы листерий – *L. monocytogenes* MA554, *L. monocytogenes* ББ1 или *L. monocytogenes* YIM3 – из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Пригодность разработанных мышинных моделей для оценки эффективности антибактериальных препаратов мы проверили в экспериментах по антибиотикотерапии листериоза.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Для моделирования экспериментальной листериозной инфекции использовали три штамма *L. monocytogenes* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Штамм MA554 (Инв. № В-9071) выделен из ликвора ребенка, больного менингитом; штамм ББ1 (Инв. № В-7495) выделен из патологоанатомического материала умершего цыпленка; штамм YIM3 (Инв. № В-9109) выделен из ликвора взрослого человека, больного менингитом. Культуры листерий чувствительны к ампициллину (≤ 1 мкг/мл), гентамицину (минимальная подавляющая концентрация (МПК) ≤ 4 мкг/мл), ко-тримоксазолу (МПК $\leq 0,06$ мкг/мл по триметоприму).

Питательные среды, антибиотики

Для культивирования штаммов *L. monocytogenes* использовали плотную питательную среду №1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением 2% гемолизированной крови. Определение чувствительности бактериальных штаммов к антибактериальным препаратам проводили на питательной среде Мюллера–Хинтона (Hi-Media, Индия). В качестве селективной среды для выявления листерий в фекалиях мышей использовали агаризированную среду ПАЛ с селективной добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Для лечения экспериментального листериоза использовали ампициллина натриевую соль (PanReac Appli Chem, Испания), гентамицин (KRKA, Словения) и ко-тримоксазол (Biocraft, Германия).

Лабораторные животные

В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали мышей линии BALB/c (самцы/самки, вес 15–18 г). Модельных животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва). Мышей размещали в поликарбонатных клетках Lab Products Inc. (США) группами не более шести животных в каждой и проводили за ними ежедневное ветеринарное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

Заражение лабораторных животных

Бактериальную взвесь для инфицирования животных готовили из ночной агаровой культуры, суспендируя ее в фи-

зиологическом растворе (0,85%-й хлорид натрия). Взвеси доводили до плотности 3,7 по стандарту оптической мутности МакФарланда, что приблизительно соответствует 2×10^9 КОЕ/мл. Затем делали последовательные разведения суспензий до достижения необходимой концентрации клеток *L. monocytogenes*. Культуры вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Для инъекций использовали инсулиновые шприцы с иглой 26–28 G. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем посева по 0,1 мл из соответствующих разведений исходной взвеси на плотную питательную среду №1 ГРМ с добавлением гемолизированной крови. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C.

Изучение динамики развития листериозного сепсиса

Развитие генерализованной инфекции, вызываемой культурами *L. monocytogenes* MA554, YIM3 и ББ1, изучали на мышах линии BALB/c. Животных инфицировали внутрибрюшинно ночной агаровой культурой листерий в дозе 200 LD₅₀. Бактериальные взвеси вводили мышам в объеме 0,5 мл. Среднелетальная доза штамма MA554 составляет $6,9 \times 10^4$ КОЕ, штамма YIM3 – $2,0 \times 10^4$ КОЕ, штамма ББ1 – $7,0 \times 10^4$ КОЕ.

Диссеминацию клеток патогена в организме экспериментальных животных оценивали по степени специфической бактериальной инвазии паренхиматозных органов и уровню бактериемии через 3, 6, 12, 24 и 48 ч после инфицирования. В каждый временной интервал по пять животных подвергали эвтаназии и отбирали селезенку, легкие, мозг и кровь для проведения количественного бактериологического анализа. Кроме того, для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития острой листериозной инфекции через 48 ч после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови. В это же время проводили гистологические исследования внутренних органов мышей – селезенки, легких, печени, головного мозга, регионарных лимфатических узлов и тимуса.

Клинический анализ крови

Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе PCE-90Vet (High Technology, США) в соответствии с руководством по использованию прибора. Для сбора крови применяли микропробирки с K2-ЭДТА.

Биохимический анализ крови

Биохимический анализ крови (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), общий белок, глюкоза, креатинин) проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax-3300 (Awareness Technology, США) с использованием жидких реактивов UTS (ООО «Юнимед», Россия).

Бактериологический анализ органов

Животных подвергали эвтаназии методом декапитации, а затем вскрывали для получения образцов органов. Селезенку, печень и легкие растирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенаты добавляли 1 мл стерильного физиологического раствора и перемешивали.

вали до получения однородной суспензии. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения) высевали на поверхность питательного агара. В качестве питательной среды для выявления культуры листерий использовали питательную среду – ПАЛ-агар с селективной добавкой. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч.

Гистологическое исследование органов и тканей

Гистологическое исследование проводили через 48 ч после внутрибрюшинного заражения (на пике сепсиса) мышей культурами *L. monocytogenes* MA554, YIM3 и ББ1. В качестве контролей использовали интактных мышей линии BALB/c. После эвтаназии у животных препарировали селезенку, легкие, печень, головной мозг, регионарные лимфатические узлы и тимус.

Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа Nikon Elipse 80i и программы анализа изображения NIS Elements F4.60.00. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

Антибиотикотерапия летальной листериозной инфекции

Летальную листериозную инфекцию воспроизводили на мышах линии BALB/c. Мышей (самцы/самки, 15–18 г) заражали внутрибрюшинно культурами штаммов *L. monocytogenes* MA554 или *L. monocytogenes* ББ1 в дозе 200 LD₅₀. После инфицирования животных делили случайным образом на четыре лечебных и одну контрольную группы по 8 животных в каждой. Мышей из 1-й и 2-й групп лечили ко-тримоксазолом (250 мг/кг) один раз в день внутривентрикулярно. Терапию начинали через 3 и 24 ч соответственно и продолжали 5 суток. Мыши из 3-й и 4-й групп получали комбинированное лечение ампициллином (100 мг/кг) и гентамицином (20 мг/кг) дважды в день. Продолжительность лечения 5 дней. Антибиотикотерапию начинали через 3 и 24 ч после заражения. Группа №5 являлась контрольной и не получала антибактериальных препаратов.

Статистическую обработку результатов (вычисление среднего арифметического значений и стандартного отклонения, двухсторонний критерий Стьюдента) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2010 и статистической программы Statistica 10.

Статистические методы

Результаты бактериологического анализа показали, что штаммы YIM3, MA554 и ББ1 *L. monocytogenes* после внутрибрюшинного введения в дозе 200 LD₅₀ вызывают у мышей линии BALB/c развитие системной инфекции – сепсиса. Культура *L. monocytogenes* была выявлена у всех животных из селезенки и легких через 3 ч после заражения. Обсемененность селезенки этими штаммами составила 4,21; 6,04 и 5,04 Log₁₀ КОЕ/г соответственно (табл. 1–3).

Результаты и обсуждение

Модель летального листериозного сепсиса у мышей

Результаты бактериологического анализа показали, что штаммы YIM3, MA554 и ББ1 *L. monocytogenes* после внутрибрюшинного введения в дозе 200 LD₅₀ вызывают у мышей линии BALB/c развитие системной инфекции – сепсиса. Культура *L. monocytogenes* была выявлена у всех животных из селезенки и легких через 3 ч после заражения. Обсемененность селезенки этими штаммами составила 4,21; 6,04 и 5,04 Log₁₀ КОЕ/г соответственно (табл. 1–3).

Таблица 1. Обсемененность селезенки, легких и крови мышей бактериями *L. monocytogenes* YIM3 в различные сроки острой листериозной инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 200 LD₅₀

Время после заражения, ч	Log ₁₀ КОЕ/г (мл) клеток <i>L. monocytogenes</i> YIM3*		
	Селезенка	Легкое	Кровь
3	4,21 ± 0,28 (5/5)**	3,70 ± 0,30 (5/5)	0 (5/5)
6	4,78 ± 0,09 (5/5)	4,25 ± 0,70 (5/5)	1,53 ± 0,39 (3/5)
12	4,76 ± 0,44 (5/5)	4,65 ± 0,28 (5/5)	1,66 ± 0,28 (3/5)
24	5,25 ± 0,34 (5/5)	4,81 ± 0,45 (5/5)	1,65 ± 0,09 (2/5)
48	7,45 ± 0,35 (5/5)	6,44 ± 0,12 (5/5)	2,14 ± 0,14 (5/5)

*представлены средние значения и стандартное отклонение (n = 5);
**в дробе указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *L. monocytogenes* YIM3, к общему количеству животных в группе.

Таблица 2. Обсемененность селезенки, легких и крови мышей бактериями *L. monocytogenes* ББ1 в различные сроки острой листериозной инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 200 LD₅₀

Время после заражения, ч	Log ₁₀ КОЕ/г (мл) клеток <i>L. monocytogenes</i> ББ1*		
	Селезенка	Легкое	Кровь
3	5,04 ± 0,53 (5/5)**	4,66 ± 0,82 (5/5)	1,75 ± 0,31 (5/5)
6	4,51 ± 0,83 (5/5)	3,74 ± 0,96 (5/5)	1,69 ± 0,81 (2/5)
12	5,73 ± 1,01 (5/5)	4,72 ± 1,43 (5/5)	2,32 ± 0,19 (3/5)
24	6,60 ± 0,42 (5/5)	5,57 ± 0,57 (5/5)	2,43 ± 0,19 (2/5)
48	7,44 ± 0,36 (5/5)	6,02 ± 0,32 (5/5)	2,76 ± 0,57 (5/5)

*представлены средние значения и стандартное отклонение (n = 5);
**в дробе указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *L. monocytogenes* ББ1, к общему количеству животных в группе.

Таблица 3. Обсемененность селезенки, легких, мозга и крови мышей бактериями *L. monocytogenes* MA554 в различные сроки острой листериозной инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 200 LD₅₀

Время после заражения, ч	Log ₁₀ КОЕ/г (мл) клеток <i>L. monocytogenes</i> MA554*			
	Селезенка	Легкое	Мозг	Кровь
3	6,04 ± 0,71 (5/5)**	5,28 ± 0,91 (5/5)	0 (5/5)	1,90 ± 0,47 (5/5)
6	5,95 ± 0,51 (5/5)	5,84 ± 0,46 (5/5)	0 (5/5)	2,36 ± 0,42 (3/5)
12	6,37 ± 0,07 (5/5)	5,89 ± 0,51 (5/5)	2,70 ± 0,57 (2/5)	2,78 ± 0,47 (5/5)
24	7,75 ± 0,57 (5/5)	6,37 ± 0,68 (5/5)	2,89 ± 0,63 (3/5)	3,14 ± 0,32 (5/5)
48	8,05 ± 0,82 (5/5)	6,41 ± 0,69 (5/5)	3,18 ± 0,92 (5/5)	3,60 ± 0,92 (5/5)

*представлены средние значения и стандартное отклонение (n = 5);
**в дробе указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *L. monocytogenes* MA554, к общему количеству животных в группе.

Таблица 4. Результаты клинического анализа крови мышей BALB/c ($n = 5$) после внутрибрюшинного введения 200 LD₅₀ культур *L. monocytogenes* штаммов YIM3, ББ1 и МА554 через 48 ч после заражения

Показатель	Ед. изм.	Контроль (интактный)	Штамм <i>L. monocytogenes</i>		
			YIM3	ББ1	МА554
Лейкоциты	$\times 10^9/\text{л}$	$8,2 \pm 1,7$	$8,5 \pm 2,0$	$7,7 \pm 2,8$	$6,4 \pm 2,9$
Лимфоциты	$\times 10^9/\text{л}$	$5,9 \pm 0,9$	$1,9 \pm 1,1$	$2,0 \pm 1,4$	$1,0 \pm 0,6$
Моноциты	$\times 10^9/\text{л}$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
Гранулоциты	$\times 10^9/\text{л}$	$2,1 \pm 0,8$	$6,2 \pm 1,4$	$5,6 \pm 2,5$	$5,2 \pm 2,4$
Лимфоциты	%	$72,4 \pm 4,4$	$22,3 \pm 11,3$	$25,2 \pm 12,8$	$16,3 \pm 4,0$
Моноциты	%	$2,6 \pm 0,2$	$3,4 \pm 1,2$	$3,0 \pm 0,8$	$3,0 \pm 1,0$
Гранулоциты	%	$25,1 \pm 4,5$	$74,4 \pm 12,4$	$71,8 \pm 13,6$	$80,8 \pm 4,5$
Эритроциты	$\times 10^{12}/\text{л}$	$9,62 \pm 0,12$	$9,41 \pm 0,39$	$8,79 \pm 0,43$	$9,19 \pm 0,36$
Гемоглобин	г/л	142 ± 9	134 ± 5	127 ± 9	134 ± 5
Гематокрит	%	$41,6 \pm 2,6$	$39,5 \pm 1,5$	$39,4 \pm 2,9$	$39,8 \pm 1,6$
Средний объем эритроцита	фл	$43,3 \pm 2,3$	$42,1 \pm 2,5$	$44,9 \pm 1,8$	$43,4 \pm 1,2$
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	пг	$14,7 \pm 0,8$	$14,2 \pm 0,9$	$14,4 \pm 0,5$	$14,5 \pm 0,2$
Средняя концентр. гемоглобина в эритроците	г/л	340 ± 4	338 ± 3	323 ± 3	337 ± 7
Ширина распр. эритроцитов	–	$17,9 \pm 2,1$	$17,9 \pm 2,7$	$17,6 \pm 1,4$	$17,5 \pm 2,4$
Тромбоциты	$\times 10^9/\text{л}$	634 ± 50	627 ± 135	608 ± 163	583 ± 98
Средний объем тромбоцита	фл	$4,4 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,3$
Ширина распр. тромбоцитов	–	$15,8 \pm 0,4$	$15,6 \pm 0,2$	$15,7 \pm 0,3$	$15,7 \pm 0,2$
Тромбоциты	%	$0,278 \pm 0,01$	$0,302 \pm 0,070$	$0,301 \pm 0,092$	$0,283 \pm 0,041$

Концентрация клеток листерий штаммов YIM3, МА554 и ББ1 в легких составила в среднем 3,7; 5,28 и 4,66 Log₁₀ КОЕ/г соответственно. В дальнейшем бактериальная инвазия органов увеличивалась и достигала своего максимума через 2 суток после инфицирования. Количество бактерий *L. monocytogenes* в селезенке достигало 7,44–8,05 Log₁₀ КОЕ/г, а в легочной ткани – 6,02–6,44 Log₁₀ КОЕ/г.

Бактериemia появлялась у животных через 3 ч после заражения культурами штаммов МА554 и ББ1 и через 6 ч после заражения штаммом YIM3. В процессе развития инфекции количество листерий в крови нарастало. Наиболее выраженная бактериemia была у животных на 2-е сутки инфекции. Концентрация клеток штамма YIM3 составляла 2,14 Log₁₀ КОЕ/мл, клеток штамма ББ1 – 2,76 Log₁₀ КОЕ/мл, клеток штамма МА554 – 3,6 Log₁₀ КОЕ/мл. Количество животных с бактериемией после заражения штаммами МА554 и ББ1 сначала сокращалось, а затем опять достигло 100% к 12 и 48 ч соответственно. Похожий эффект наблюдался и в случае штамма YIM3.

В ходе бактериологических исследований было установлено, что листерии штамма МА554 преодолевали гематоэнцефалический барьер и проникали в головной мозг животных. По крайней мере, через 12 ч после заражения у 2 из 5 животных в посевах из головного мозга была обнаружена культура *L. monocytogenes* МА554. Через 24 ч культура была идентифицирована у 3 из 5 животных, а через 48 ч – у всех инфицированных мышей. Концентрация клеток *L. monocytogenes* МА554 в тканях головного мозга мышей повышалась с 2,70 до 3,18 Log₁₀ КОЕ/г. В то же время при заражении мышей штаммами ББ1 и YIM3 патоген в головном мозге мышей не был обнаружен в течение всего периода наблюдения (48 ч после инфицирования).

В ходе экспериментов было установлено, что мыши, инфицированные внутрибрюшинно культурами штаммов

L. monocytogenes, теряли в весе 1–2 г в ходе развития листериозного сепсиса, что свидетельствует о тяжести заболевания. Следует отметить, что после заражения мышей культурами штаммов YIM3, ББ1 и МА554 в дозе 200 LD₅₀ гибель животных отмечалась со 2-х по 5-е сутки (рис. 1). У 100% умерших животных был выделен возбудитель инфекции – *L. monocytogenes*.

Общий анализ крови мышей, зараженных внутрибрюшинно культурами *L. monocytogenes*, показал, что через 2 суток у мышей развивается лимфоцитопения – снижение количества лимфоцитов ($p < 0,05$) в крови, и повышается уровень содержания гранулоцитов ($p < 0,05$) (табл. 4). Других статистически значимых изменений гематологических показателей крови у инфицированных животных выявлено не было.

Биохимический анализ сывороток крови мышей, инфицированных внутрибрюшинно штаммами *L. monocytogenes*

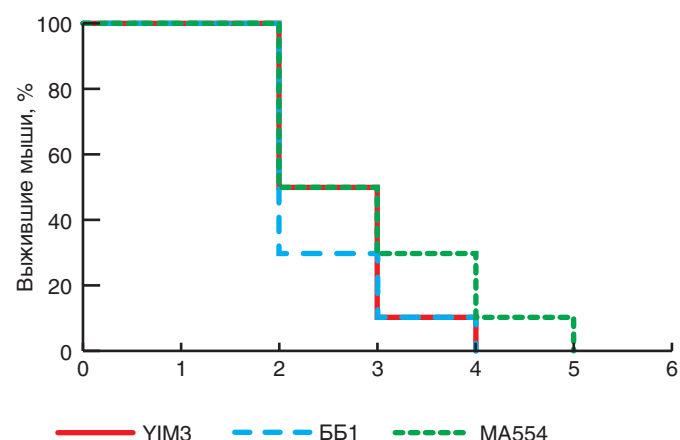


Рис. 1. Выживаемость мышей линии BALB/c (по 10 мышей в группе) после внутрибрюшинного введения 200 LD₅₀ культур *L. monocytogenes* штаммов YIM3, ББ1 и МА554.

Таблица 5. Результаты биохимического анализа крови мышей BALB/c ($n = 5$) после внутрибрюшинного введения 200 LD₅₀ культур *L. monocytogenes* штаммов YIM3, ББ1 и МА554 через 48 ч после заражения

Показатель	Ед. изм.	Контроль	Штамм <i>L. monocytogenes</i>		
			YIM3	ББ1	МА554
Общий белок	г/л	83,0 ± 10,7	87,9 ± 6,9	79,5 ± 10,0	81,8 ± 9,0
Глюкоза	ммоль/л	3,57 ± 1,08	3,49 ± 0,68	4,39 ± 1,55	4,13 ± 2,24
АСТ	МЕ/л	115,4 ± 15,6	207,1 ± 76,8	194,9 ± 45,2	199,9 ± 6,29
АЛТ	МЕ/л	50,9 ± 8,5	67,4 ± 2,4	70,5 ± 2,2	66,5 ± 0,3
Креатинин	мкмоль/л	36,8 ± 2,8	47,1 ± 2,7	52,4 ± 5,4	122,2 ± 3,5
ЩФ	МЕ/л	334,1 ± 30,6	144,9 ± 59,5	120,5 ± 71,3	152,6 ± 51,4

YIM3, ББ1 и МА554, который был проведен через 48 ч после заражения, показал отсутствие статистически достоверных изменений уровня общего белка и глюкозы в сыворотке крови по сравнению с контролем (табл. 5). С другой стороны, у мышей наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества АСТ, АЛТ и креатинина. Уровень ЩФ снижался в 2,1–2,7 раза.

Гистологические исследования внутренних органов (селезенка, печень, паховые лимфатические узлы, головной мозг, легкие) мышей были проведены через 48 ч после внутрибрюшинного заражения штаммами *L. monocytogenes* YIM3, ББ1 и МА554 в дозе 200 LD₅₀.

Штамм *L. monocytogenes* YIM3. Микроскопическое исследование селезенки у мышей, инфицированных культурой штамма *L. monocytogenes* YIM3, выявило различный характер изменений. У части мышей патологии в селезенке не обнаружено (рис. 2А). Белая пульпа занимает основную площадь в селезенке. Содержит большое количество крупных, часто сливающихся между собой лимфатических фолликулов с обширными активными центрами размножения. Красная пульпа плотно заполнена лимфоцитами. Встречаются небольшие скопления нейтрофилов. У других животных наблюдается выраженная патологическая картина. Лимфатические фолликулы небольших размеров резко ограничены от окружающей красной пульпы. В центральной части лимфатических фолликулов, на месте центров размножения, часто обнаруживаются очаги некроза. Красная пульпа малоклеточная. Основную площадь занимают клетки ретикуломакрофагальной стромы с диффузно расположенными нейтрофилами. Эти клетки подвергаются некрозу с образованием обширных очагов из рыхлого скопления детрита (рис. 2Б). В красной пульпе

сохраняется некоторое количество лимфоцитов и плазматических клеток.

Паховые лимфатические узлы всех инфицированных мышей имеют небольшие размеры. Кортикальная зона слабо выражена. Лимфатические фолликулы без центров размножения. В мозговой зоне в результате уменьшения клеточной инфильтрации появляются участки, состоящие только из клеток стромы. Просветы синусов расширены, клетки в них не выявлены (рис. 3).

У одного животного из пяти в печени выявлены множественные некрозы. Некротизированные участки имеют округлую форму и представляют собой скопление мелких базофильно окрашенных частиц. Участок некроза резко ограничен от окружающей паренхимы, которая имеет нормальное строение (рис. 4А).

Большинство животных имели изменения в печени, проявляющиеся в виде клеточной инфильтрации. В капиллярах печени обнаруживалось большое количество клеток, среди которых преобладали моноциты и нейтрофилы. Эти клетки часто образовывали небольшие скопления (рис. 4Б).

Микроскопический анализ срезов головного мозга мышей, инфицированных внутрибрюшинно *L. monocytogenes* YIM3, не выявил видимых морфологических изменений. Структура головного мозга соответствовала норме.

В легких мышей, зараженных штаммом *L. monocytogenes* YIM3, не выявлено микроскопических отклонений от нормы. Межальвеолярные перегородки тонкие, без инфильтрации. Просветы альвеол чистые, без экссудата.

Штамм *L. monocytogenes* ББ1. При гистологическом исследовании селезенки мышей линии BALB/c, инфицированных культурой *L. monocytogenes* ББ1, было выявлено резкое уменьшение количества лимфоцитов в белой и крас-

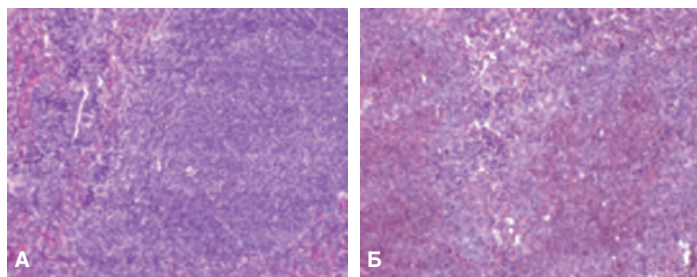


Рис. 2. Микрофотографии срезов селезенки мышей BALB/c, инфицированных вбрюшную культуру *L. monocytogenes* YIM3. 48 ч после заражения.

А – Патологии нет. Увеличение $\times 10$; Б – Очаги некроза в центральной части лимфатических фолликулов. Красная пульпа малоклеточная. Увеличение $\times 10$.

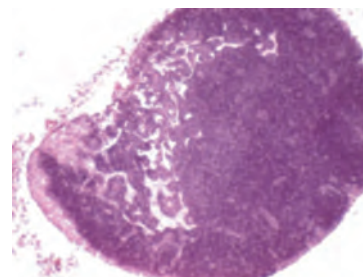


Рис. 3. Микрофотографии срезов лимфатического узла мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* YIM3. 48 ч после заражения. Увеличение $\times 4$. Центры размножения лимфоцитов отсутствуют. В мозговой зоне уменьшение клеточной инфильтрации.

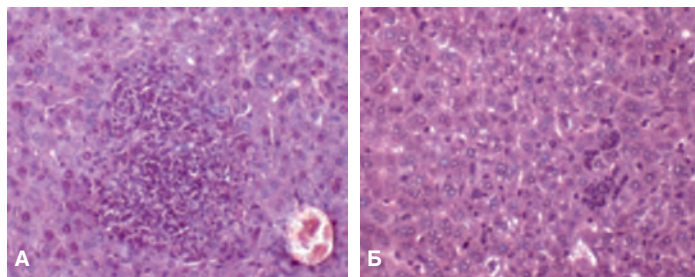


Рис. 4. Микрофотографии срезов печени мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* YIM3. Увеличение $\times 20$. 48 ч после заражения.

А – множественные некрозы в ткани печени; Б – клеточная инфильтрация печени клетками (моноцитами, лейкоцитами, лимфоцитами и плазматическими клетками).

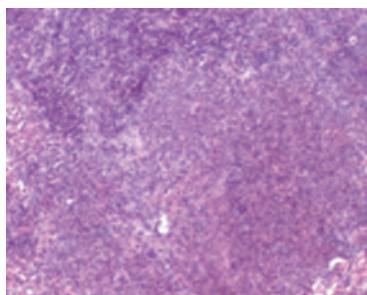


Рис. 5. Микрофотографии срезов селезенки мышей BALB/c, инфицированных в/бр культурой *L. monocytogenes* BB1. Увеличение $\times 10$. 48 ч после заражения.

Очаги некроза различных размеров в красной пульпе, состоящие из разрушенных нейтрофилов. Наличие большого количества микробных клеток в некротическом субстрате.

ной пульпе. На месте лимфатических фолликулов сохраняются небольшие скопления лимфоцитов. В красной пульпе преобладают нейтрофилы, которые часто образуют некротические очаги разной величины. Крупные очаги имеют рыхлую структуру, поскольку в них наряду с нейтрофилами имеются разрушенные клетки ретикуломакрофагальной стромы. Среди некротического субстрата находится множество микробных клеток (рис. 5).

Микроскопический анализ срезов печени мышей, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* BB1, показал наличие большого количества лейкоцитов в печени. В паренхиме изредка встречаются обширные инфильтраты из нейтрофилов (рис. 6А) и некротические очаги (рис. 6Б) из разрушенных клеток инфильтрата и клеток печени (гепатоцитов).

Патология в паховых лимфатических узлах отсутствует. Все зоны пахового лимфатического узла плотно заполнены лимфоцитами. В коре имеются фолликулы с центрами размножения, что свидетельствует о развитии пролиферативных процессов (рис. 7).

В коре полушарий головного мозга выявлены множественные очаговые инфильтраты из круглоядерных клеток (рис. 8).

Микроскопическая картина легких мышей оставалась в пределах нормы. Структурных изменений легочной ткани не наблюдалось.

Штамм *L. monocytogenes* MA554. Гистологическая картина селезенки у мышей, инфицированных культурой штамма *L. monocytogenes* MA554, различается по степени выра-

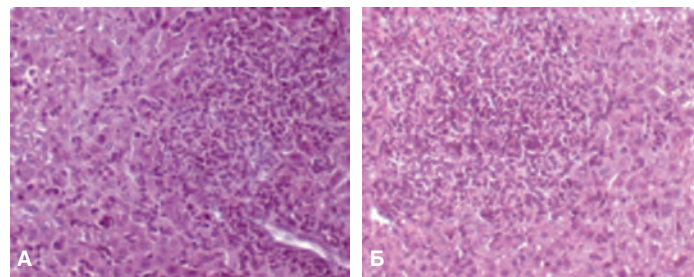


Рис. 6. Микрофотографии срезов печени мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* BB1. Увеличение $\times 20$. 48 ч после заражения.

А – Обширные инфильтраты из полиморфноядерных клеток в ткани печени; Б – Очаг некроза.

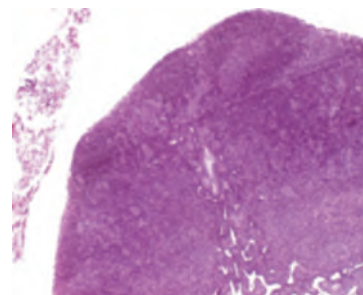


Рис. 7. Микрофотографии срезов лимфатического узла мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* BB1. 48 ч после заражения. Увеличение $\times 4$.

Патологических изменений нет.

женности патологии. У некоторых животных селезенка имеет выраженную степень развития в ней деструктивных изменений – некрозов (рис. 9А). Некрозы занимают основную площадь в селезенке. Некротизированная ткань представлена множеством мелких базофильно окрашенных частиц – продуктов распада клеток, расположенных между волокон соединительной ткани стромы. Там же обнаруживаются в большом количестве микробные клетки.

У некоторых мышей в селезенке отсутствуют патологические изменения и преобладает картина иммунной перестройки. Белая пульпа состоит из множества лимфатических фолликулов, часто с центрами размножения. Красная пульпа заполнена лимфоцитами и плазматическими клетками (рис. 9Б).

Лимфатические узлы увеличены. Они имеют широкую корковую зону, содержащую фолликулы с центрами размножения. Мякотные тяжи и синусы мозговой зоны заполнены лимфоцитами. Кроме того, в лимфатическом узле развиваются деструктивные процессы. В коре имеются участки делимфотизации, в которых, на фоне сохранившихся компонентов стромы, находятся частички детрита (рис. 10).

Гистологическое исследование печени мышей, инфицированных штаммом *L. monocytogenes* MA554, показало, что у некоторых мышей образуется множество очагов некроза. Большинство очагов состоит из мелких частиц детрита, образовавшегося из некротизированных клеток. В некоторых очагах среди базофильно окрашенных частиц имеются участки гомогенной консистенции светло-розовой окраски (рис. 11). У других животных этой группы изменения ограни-

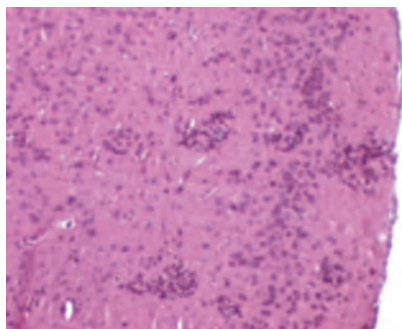


Рис. 8. Микрофотографии срезов головного мозга мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* ББ1. 48 ч после заражения. Инфильтрация мозговой ткани круглоядерными клетками. Увеличение $\times 10$.

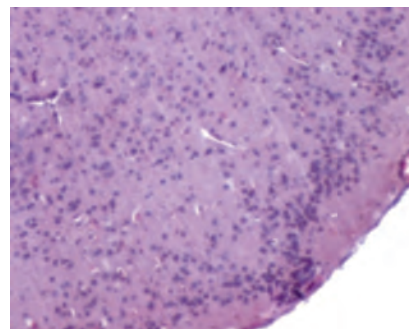


Рис. 12. Микрофотографии срезов головного мозга мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* MA554. Увеличение $\times 10$. 48 ч после заражения. Инфильтрация мозговой ткани круглоядерными клетками.

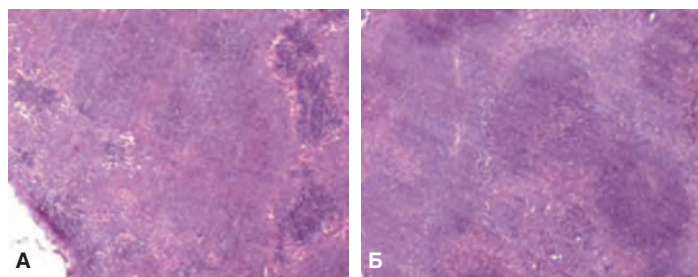


Рис. 9. Микрофотографии срезов селезенки мышей BALB/c, инфицированных в/бр культурой *L. monocytogenes* MA554. 48 ч после заражения.

А – Очаги некроза в центральной части лимфатических фолликулов. Красная пульпа малоклеточная. Увеличение $\times 4$; Б – насыщение красной пульпы лимфоцитами и плазматическими клетками. Увеличение $\times 4$.

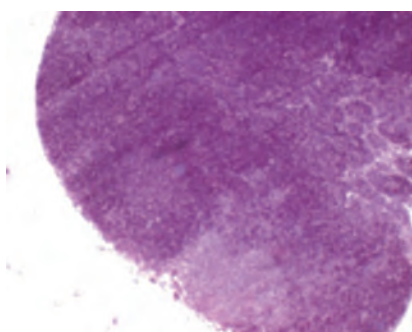


Рис. 10. Микрофотографии срезов лимфатического узла мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* MA554. 48 ч после заражения. Увеличение $\times 4$. В лимфатическом узле на фоне интенсивной инфильтрации и пролиферации лимфоцитов развиваются некротические процессы.

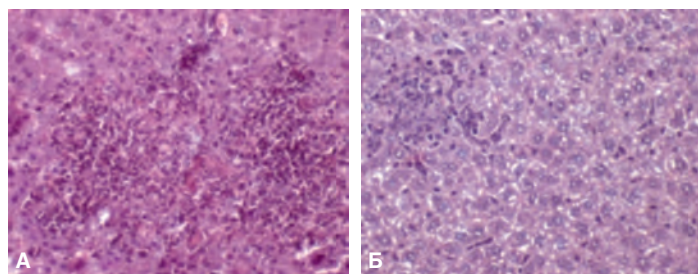


Рис. 11. Микрофотографии срезов печени мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *L. monocytogenes* MA554. Увеличение $\times 20$. 48 ч после заражения.

А – Множественные очаги некроза; Б – Лейкоцитарная инфильтрация ткани печени.

чиваются инфильтрацией паренхимы нейтрофилами (рис. 11Б).

В коре полушарий головного мозга у некоторых мышей выявлены диффузные и очаговые инфильтраты из круглоядерных клеток (рис. 12).

В легких не выявлено микроскопических отклонений от нормы.

Антибиотикотерапия экспериментальной листериозной инфекции

Пригодность разработанной нами мышинной модели летального листериоза оценивали в эксперименте по антибиотикотерапии инфекции, вызываемой штаммами *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1. После внутрибрюшинного заражения мышей линии BALB/c бактериальными взвешиваемыми в дозе 200 LD₅₀ животных делили случайным образом на равные группы по 8 особей и лечили в соответствии со схемой, представленной в табл. 6.

Результаты антибиотикотерапии летальной инфекции, обусловленной штаммом *L. monocytogenes* MA554, показали высокую эффективность раннего начала приема препаратов – через 3 ч после заражения. Все мыши, получавшие ко-тримоксазол или ампициллин с гентамицином ежедневно в течение 5 дней, оставались живыми до конца срока наблюдения (14 суток). Более позднее начало терапии этими антибиотиками обеспечивало выживаемость 75 и 87,5% инфицированных мышей соответственно. Все контрольные (без лечения) животные пали в течение 4 суток после заражения. Результаты антибиотикотерапии экспериментальной листериозной инфекции у мышей представлены на рис. 13.

Из всех павших в ходе эксперимента животных – опытных и контрольных – была выделена культура *L. monocytogenes* MA554. Бактериологический анализ, проведенный на 14-й день после инфицирования, показал отсутствие клеток патогена возбудителя в селезенке, головном мозге и крови мышей.

Антибиотикотерапия сепсиса, обусловленного *L. monocytogenes* ББ1, также была высокоэффективна. Введение ко-тримоксазола или ампициллина с гентамицином через 3 ч после инфицирования дало абсолютный лечебный результат: все мыши из лечебных групп выжили в течение 2 нед. При более позднем назначении этих препаратов выживаемость мышей составила 87,5 и 75% соответ-

Таблица 6. Схема лечения летальной листериозной инфекции, обусловленной *L. monocytogenes*, у мышей линии BALB/c

№ группы	Кол-во мышей в группе	Препарат	Разовая доза препарата, мг/кг	Введение препаратов после заражения
1	8	Ко-тримоксазол	250 по триметоприму	Внутрижелудочно через 3 ч после заражения, далее 1 раз в сутки, 5 дней
2	8	Ко-тримоксазол	250 по триметоприму	Внутрижелудочно через 24 ч после заражения, далее 1 раз в сутки, 5 дней
3	8	Ампициллин + гентамицин	100 + 20	Подкожно, через 3 ч после заражения, 2 раза в сутки, 5 дней
4	8	Ампициллин + гентамицин	100 + 20	Подкожно, через 24 ч после заражения, 2 раза в сутки, 5 дней
5	8	Без лечения		

ственно. Все выжившие животные не были носителями *L. monocytogenes* ББ1.

100% контрольных животных умерли в период со 2-х по 4-е сутки после заражения. От павших животных была выделена культура листерий из селезенки, головного мозга и крови. Результаты антибиотикотерапии экспериментальной листериозной инфекции у мышей представлены на рис. 14.

Летальные модели инфекций весьма удобны в исследованиях по изучению специфической активности антибиотиков, бактериофагов и других антибактериальных препаратов. Использование таких моделей дает наглядный и убедительный результат при экспериментальном лечении инфекций – выживаемость животных. Мыши являются наиболее привлекательным видом лабораторных животных для моделирования благодаря их невысокой стоимости и доступности. Ранее мы разработали и успешно применили мышинные модели летального сепсиса, обусловленного различными бактериальными агентами [43–54].

В данной статье мы описали модели экспериментальной листериозной инфекции, вызываемые тремя штаммами *L. monocytogenes* – MA554, YIM3 и ББ1. Эти штаммы были отобраны из коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» и в предварительных экспериментах показали наибольшую вирулентность для мышей линии BALB/c. Показатель LD₅₀ этих штаммов при внутрибрюшинном введении составил $6,9 \times 10^4$ КОЕ, $2,0 \times 10^4$ КОЕ и $7,0 \times 10^4$ КОЕ соответственно. Следует отметить, что самки мышей этой линии оказались более чувствительными к листериозной инфекции, чем самцы (данные не представле-

ны). Подобный факт отмечают и другие исследователи, моделирующие листериоз [49]. Аутбредные мыши оказались менее чувствительными к внутрибрюшному заражению, чем мыши линии BALB/c. В предварительных экспериментах было установлено, что внутрибрюшинное введение этим животным культуры *L. monocytogenes* MA554, *L. monocytogenes* YIM3 и *L. monocytogenes* ББ1 в количестве 1×10^4 КОЕ не вызывало гибели ни одной беспородной мыши, тогда как у мышей BALB/c наблюдался падеж различной интенсивности. Более высокую чувствительность линейных мышей к листериозной инфекции отмечали и другие исследователи, указывая на мышей BALB/c, C57BL/6, A/J [40, 41]. Высокий уровень вирулентности выбранных нами штаммов не требовал дополнительного увеличения чувствительности к инфицированию модельных животных. Однако для моделирования листериозной инфекции некоторые исследователи используют мышей с индуцированным иммунодефицитом, что позволяет повысить вирулентность штаммов на 4 порядка [39, 50].

Для моделирования острого листериозного сепсиса у мышей мы использовали высокую заражающую дозу *L. monocytogenes* – 200 LD₅₀. При внутрибрюшинном введении мышам BALB/c культур штаммов MA554, YIM3 и ББ1 в количестве $1,4 \times 10^7$ КОЕ, 4×10^6 КОЕ и $1,4 \times 10^7$ КОЕ соответственно все животные погибают в течение 5 суток, а первые случаи падежа наступают через 2 суток. Такая динамика гибели мышей от листериозной инфекции дает возможность начинать экспериментальное лечение инфекции в более отдаленные сроки – через 24 ч после инфицирования.

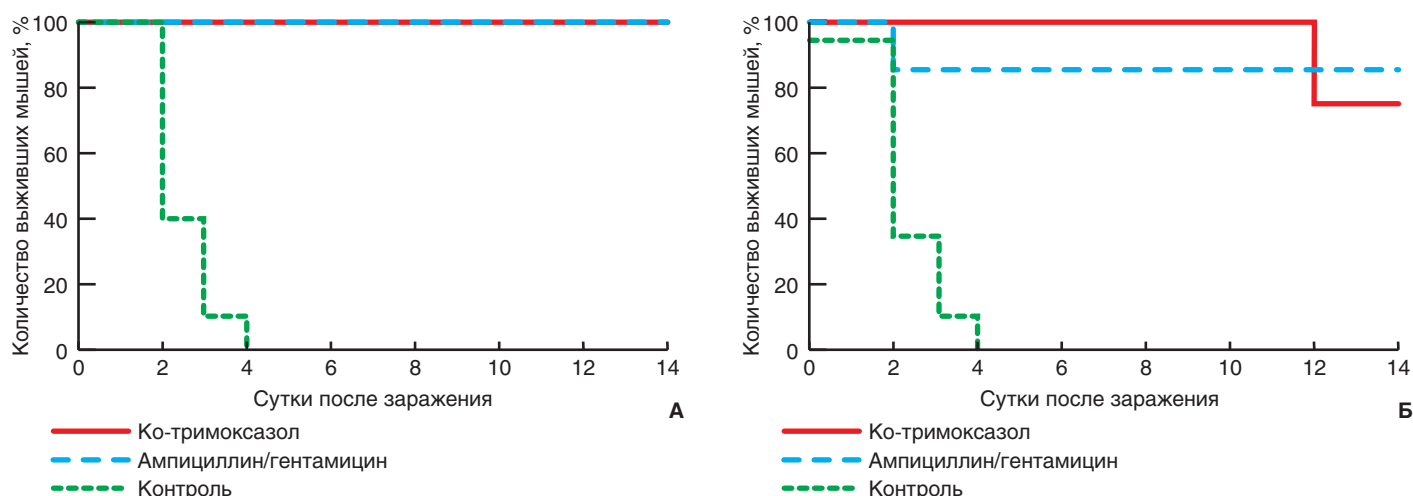


Рис. 13. Лечебная эффективность ко-тримоксазола и ампициллина с гентамицином при лечении летальной инфекции у мышей BALB/c, вызванной внутрибрюшинным введением 200 LD₅₀ культуры *L. monocytogenes* MA554

А – начало лечения через 3 ч после заражения, Б – начало лечения через 24 ч после заражения.

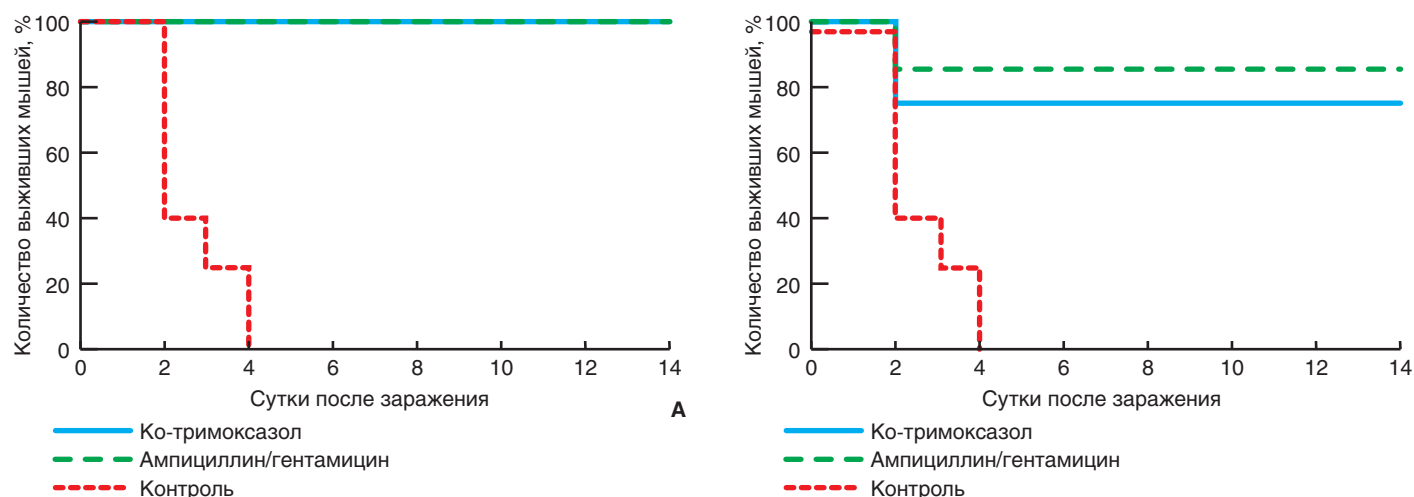


Рис. 14. Лечебная эффективность ко-тримоксазола и ампициллина с гентамицином при лечении летальной инфекции у мышей BALB/c, вызванной внутрибрюшинным введением 200 LD₅₀ культуры *L. monocytogenes* ББ1. А – начало лечения через 3 ч после заражения, Б – начало лечения через 24 ч после заражения.

Динамика диссеминации бактерий *L. monocytogenes* в организме мышей оказалась очень интенсивной и имела штаммовые различия. Уже через 3 ч после внутрибрюшинного введения клетки листерий всех 3 штаммов в большом количестве обнаруживались в легких и селезенке мышей BALB/c, что говорит о тяжести листериоза. В то же время бактериемия развивалась у мышей только в случае *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1. Бактерии *L. monocytogenes* YIM3 обнаруживались в крови мышей только через 6 ч после заражения. Бактериологические исследования выявили высокие инвазивные свойства штамма MA554, который преодолевает гематоэнцефалический барьер. Через 12 ч бактерии штамма MA554 обнаруживаются лишь у некоторых инфицированных мышей, а через сутки – у 100% животных. Интересно, что даже при внутривенном введении листерий инвазия головного мозга случается редко и только при экстремально высокой заражающей дозе [51].

Гематологические исследования показали одинаковые изменения в формуле крови мышей BALB/c, инфицированных всеми изученными нами штаммами листерий: лимфоцитопению и повышение количества моноцитов. Такие результаты, полученные на 2-е сутки после заражения, являются характерными для летальной листериозной инфекции и свидетельствуют о развитии инфекционного процесса у мышей.

Существенные изменения показателей уровня АСТ, АЛТ, ЩФ и креатинина в сыворотке крови мышей BALB/c через 48 ч после заражения свидетельствуют о серьезном нарушении функции печени и почек у инфицированных мышей, которое также связано с развитием выраженной листериозной инфекции.

Пригодность разработанной нами модели летального листериоза у мышей мы оценивали в экспериментах по его лечению. Мышей линии BALB/c инфицировали культурами *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1 в дозе 200 LD₅₀. В качестве антибактериальных препаратов мы применяли антибиотики и схемы лечения, эффективные против *L. monocytogenes*, – ко-тримоксазол и комбинацию ампициллина с гентамицином [28, 29]. *In vitro* отобранные нами модельные штаммы чувствительны к этим антибиотикам. МПК

ко-тримоксазола, ампициллина и гентамицина для штаммов *L. monocytogenes* MA554 составляют 0,06; 0,03 и 0,25 мкг/мл, а для штамма *L. monocytogenes* ББ1 – 0,06; 0,125 и 0,5 мкг/мл. Суточные дозы ко-тримоксазола (250 мг/кг), ампициллина (200 мг/кг) и гентамицина (40 мг/кг) были эквивалентны человеческим дозам [52]. Экстренное лечение летального листериоза у части мышей начинали в ранние сроки инфекции (через 3 ч после заражения), когда у животных уже наблюдался процесс генерализации инфекции, а бактериальная инвазия селезенки и легких достигала высоких значений – 6,04–5,04 Log₁₀ КОЕ/г и 5,28–4,66 Log₁₀ КОЕ/г соответственно. Позднюю антибиотикотерапию начали через сутки после заражения. В это время бактериальная обсемененность селезенки и легких увеличивалась на несколько порядков и достигала 7,75–6,60 Log₁₀ КОЕ/г и 6,37–5,57 Log₁₀ КОЕ/г соответственно. Важно, что помимо бактериальной инфильтрации паренхиматозных органов через сутки происходила инвазия головного мозга мышей клетками *L. monocytogenes* MA554 (2,89 Log₁₀ КОЕ/г), что также свидетельствовало о тяжелом течении инфекции. Следует отметить, что в период с 3 до 24 ч у животных происходила нарастание бактериемии.

Пригодность для практического применения разработанной модели листериозной инфекции была проверена в экспериментах по ее антибиотикотерапии у мышей, инфицированных культурами штаммов MA554 и ББ1 *L. monocytogenes*. Полученные результаты показали, что модель летального листериоза поддается лечению антибиотиками, активными *in vitro* в отношении этих культур. Пятидневный курс лечения инфекции ко-тримоксазолом и комбинацией ампициллина с гентамицином не только обеспечивает выживаемость инфицированных листериозом мышей линии BALB/c, но и полностью saniрует организм этих животных от клеток *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1. Раннее начало (через 3 ч после заражения) курса антибиотикотерапии дает абсолютный терапевтический эффект – 100%-ю выживаемость и элиминацию патогена из организма животных в лечебных группах. Следует отметить, что на момент начала лечения у всех зараженных животных имелся ярко

выраженный сепсис. Терапия летального листериоза ко-тримоксазолом или ампициллином/гентамицином, отложенная на сутки после инфицирования, предотвращает гибель более 75% мышей BALB/c, инфицированных обоими штаммами. Более низкая эффективность антибиотикотерапии листериозной инфекции, очевидно, связана с тем, что лечение начиналось на фоне выраженного сепсиса и развития полиорганной недостаточности у животных.

Заключение

В ходе проведенных исследований была разработана и изучена модель летальной листериозной инфекции у мышей, вызываемой вирулентными штаммами YIM3, MA554 и ББ1 *L. monocytogenes*. Внутривентральное введение мышам линии BALB/c культур этих штаммов в дозе 200 LD₅₀ приводит к гибели 100% животных в течение 2–5 суток после инфицирования. У зараженных животных происходит быстрая (в течение первых 3 ч) генерализация листериозной инфекции с диссеминацией в паренхиматозные органы и головной мозг (только для *L. monocytogenes* MA554). Инфекция характеризуется стремительным развитием некротических изменений в паренхиматозных органах мышей и нарушением функциональной активности печени и почек.

Разработанная нами модель летальной листериозной инфекции у мышей показала свою работоспособность в экспериментах по антибиотикотерапии. Эффективные *in vitro* антибиотики (ко-тримоксазол, ампициллин, гентамицин) дают положительный лечебный результат при курсовом применении и начале лечения через 3 и 24 ч после заражения мышей линии BALB/c летальной дозой (200 LD₅₀) культур *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1. Раннее начало антибиотикотерапии обеспечивает выживаемость и санацию 100% зараженных мышей, позднее начало – 75–87,5%. Предложенная нами мышинная модель летальной листериозной инфекции может быть успешно использована для оценки эффективности *in vivo* различных антибактериальных препаратов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Carpentier B, Cerf O. Reviewe persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol. 2011;145(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro. 2011.01.005

2. Orsi RH, Bakker HCD, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microbiol. 2011;301(2):79-796. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
3. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Infect. 2007;9(10):1236-1243. DOI: 10.1016/j.micinf. 2007.05.011
4. Бакулов ИА, Котляров ВМ, Шестиперова ТИ. Эпидемиологические и эпизоотологические аспекты листериоза. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1994;5:100-105.
5. Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infect Dis. 1999;5:607-626. DOI: 10.3201/eid0505.990502
6. Lecuit M. Human listeriosis and animal models. Microbes Infect. 2007;9:1216-1225. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.009
7. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host. Cold Spring Harbor Perspect. Med. 2013;3(7): a010090. DOI: 10.1101/cshperspect.a010090
8. Travier L, Guadagnini S, Gouin E, Dufour A. Act A promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. PLoS Pathog. 2013;9:e1003131.
9. Caballero S, Pamer EG. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. Annu Rev Immunol. 2015;33:227-256. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120238
10. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced changes in the intestinal microbiota and disease. Trends Mol Med. 2016;22(6):458-478. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.003
11. Zhu WM, Liu W, Wu DQ. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasserii* KT7. J Appl Microbiol. 2000;88:877-886. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01027
12. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proc Natl Acad. 2007;104(18):7617-7621. DOI: 10.1073/pnas.0700440104
13. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. J Food Sci. 2007;72:M310-M315. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00479.x
14. Schnupf P, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysine. Microbes Infect. 2007;9(10):1176-1187. DOI: 10.1016/j.micinf. 2007.05.005
15. Becattini S, Littmann ER, Carter RA. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. J Exp Med. 2017;214(N):1973-1989. DOI: 10.1084/jem.20170495
16. Louria DB, Hensle T, Armstrong D, Collins HS. Listeriosis complicating malignant disease. A new association. Ann Intern Med. 1967;67(2):260-281. DOI: 10.7326/0003-4819-67-2-261
17. Jurado RL, Farley MM, Pereira E, Harvey RC. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis. 1993;17(2):224-227. DOI: 10.1093/clinids/17.2.224
18. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis. 2008;14(5):734-740. DOI: 10.3201/eid1405.071395
19. Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany-epidemiological patterns 2001–2005. Euro Surveill. 2006;11(6):85-88.
20. Southwick FS, Purich DL. Intracellular pathogenesis of listeriosis. N Engl J Med. 1996;334(12):770-776. DOI: 10.1056/NEJM199603213341206
21. Orsi RH, Bakker HCD, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microbiol. 2011;301(2):79-796.
22. Pizarro-Cerda J, Kuhbacher A, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. Cold Spring Harbor Perspect Med. 2012;11:a010009. DOI: 10.1101/cshperspect.a010009
23. Gaillard JL, Berche P, Mounier J. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-

2. Infect Immun. 1987;55(10):2822-2829. DOI: 10.1128/IAI.55.11.2822-2829.1987
24. Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. Infect Immun. 1995;63(11):4231-4237. DOI: 10.1128/IAI.63.11.4231-4237.1995
25. de Almeida RN, Chesca AC, da Silva AD, Cecilia E. Antimicrobial sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from beef. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal. 2018;12.
26. Noll M, Kleta S, Al Dahouk S. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. Journal of Infection and Public Health. 2018;11(4):572-577. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.12.007
27. Conter M, Paludi D, Zanardi E. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 2009;128(3):497-500. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.018
28. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Microbiol Infect. 2010;16(1):16-23. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x
29. Davis JA, Jackson CR. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. Microb Drug Resist. 2009;15(1):27-32. DOI: 10.1089/mdr.2009.0863
30. Azimi PH, Koranyi K, Lindsey KD. *Listeria monocytogenes*: synergistic effects of ampicillin and gentamicin. Am J Clin Pathol. 1979;72:974-977. DOI: 10.1093/ajcp/72.6.974
31. Moellering Jr RC, Medoff G, Leech I. Antibiotic synergism against *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 1972;1(1):30-34. DOI: 10.1128/aac.1.1.30
32. Nairn K, Shepherd GL, Edwards JR. Efficacy of meropenem in experimental meningitis. J Antimicrob Chemother. 1995;36(SupplA):73-84. DOI: 10.1093/jac/36.suppl_a.73
33. Carryn S, Van B.F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Activity of β -lactams (ampicillin, meropenem), gentamicin, azithromycin and moxifloxacin against intracellular *Listeria monocytogenes* in a 24 h THP-1 human macrophage model. J Antimicrob Chemother. 2003;51(Iss.4):1051-1052. DOI: 10.1093/jac/dkg189
34. Hawkins E, Bortolussi R, Issekutz AC. *In vitro* and *in vivo* activity of various antibiotics against *Listeria monocytogenes* type 4b. Clin Invest Med. 1984(7):335-341.
35. Thonnings S, Knudsen JD, Schønheyder HC, Søgaaard M, Ostergaard C, Arpi M, et al. Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia. Clin Microbiol Infect. 2016 Aug;22(8):725-30. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.06.006
36. Методические рекомендации №11 от 2001 г. Листериоз: утверждены Председателем Комитета здравоохранения 04 апреля 2001 г.: разработаны инфекционной клинической больницей №1 Комитета здравоохранения, МГМСУ, ИПВИ им. М.П.Чумакова РАМН.
37. Страчунский ЛС, Белоусова ЮБ, Козлова СН. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Страчунского Л.С. НИИХ СГМА, 2002, 381 с.
38. Audurier A, Pardon P, Marly J, Lantier F. Experimental infection of mice with *L. monocytogenes* and *L. innocua*. Ann Microbiol. 1980;131B(1):47-57.
39. Golnazarian CA, Donnelly CW, Pintauro SJ, Howard DB. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57b1/6j mice. J Food Prot. 1989;52(10):696-701. DOI: 10.4315/0362-028X-52.10.696
40. Czuprynski CJ, Faith NG, Steinberg H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. Infect Immun. 2003;71(2):682-689. DOI: 10.1128/IAI.71.2.682-689.2003
41. Bergmann S, Beard PM, Pasche B, Lienenklaus S, Weiss S, Gahan CG. Influence of internalin A murinisation on host resistance to orally acquired listeriosis in mice. Microbiol. 2013;13(90):2-16. DOI: 10.1186/1471-2180-13-90
42. Ермолаева СА. Роль системной регуляции экспрессии генов патогенности в вирулентности *Listeria monocytogenes*. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2004, 44 с.
43. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ., Мякина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей. Бактериология. 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24
44. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Абаев ИВ. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. Инфекция и иммунитет. 2017;5:906.
45. Борзилов АИ, Мякина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Вережкин ВВ, Воложанцев НВ. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB_KpnP_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей. Бактериология. 2017;2(1):73-77. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77
46. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
47. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Денисенко ЕА, Верёвкин ВВ, Ганина ЕА, Воложанцев НВ. Эффективность фаготерапии экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей. Бактериология. 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22
48. Volozhantsev NV, Borzilov AI, Komisarova EV, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Shpirt AM, et al. Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. Antibiotics (Basel). 2020 Oct 25;9(11):732. DOI: 10.3390/antibiotics9110732
49. Bou Ghanem EN, Jones GS, Myers-Morales T, Patil PN, Hidayatullah AN, D'Orazio SEF. Inla promotes dissemination of *Listeria monocytogenes* to the mesenteric lymph nodes during food borne infection of mice. PLoS Pathog. 2012;8:e1003015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003015
50. Hof H, Emmerling P. Murine Model for Therapy of Listeriosis in the Compromised Host. III. The Effect of Rifampicin. Chemotherapy, 1984;30:125-130. DOI: 10.1159/000238258
51. Altimira J, Prats N, Lopez S, Domingo M, Briones V, Dominguez L, Marco A. Repeated oral dosing with *Listeria monocytogenes* in mice as a model of central nervous system listeriosis in man. J Comp Pathol. 1999;121:117-125. DOI: 10.1053/jcpa.1999.0303
52. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. М., 2003, 153 с.

References

1. Carpentier B, Cerf O. Reviewe persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol. 2011;145(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro. 2011.01.005
2. Orsi RH, Bakker HCD, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microbiol, 2011;301(2):79-796. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
3. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Infect. 2007;9(10):1236-1243. DOI: 10.1016/j.micinf. 2007.05.011
4. Bakulov IA, Kotlyarov VM, Shestiperova TI. Epidemiological and epizootological aspects of listeriosis. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1994;5:100-105. (In Russian).
5. Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infect Dis. 1999;5:607-626. DOI: 10.3201/eid0505.990502
6. Lecuit M. Human listeriosis and animal models. Microbes Infect. 2007;9:1216-1225. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.009

7. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host. Cold Spring Harbor Perspect. Med. 2013;3(7): a010090. DOI: 10.1101/cshperspect.a010090
8. Travier L, Guadagnini S, Gouin E, Dufour A. Act A promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. PLoS Pathog. 2013;9:e1003131.
9. Caballero S, Pamer EG. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. Annu Rev Immunol. 2015;33:227-256. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120238
10. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced changes in the intestinal microbiota and disease. Trends Mol Med. 2016;22(6):458-478. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.003
11. Zhu WM, Liu W, Wu DQ. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. J Appl Microbiol. 2000;88:877-886. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01027
12. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proc Natl Acad. 2007;104(18):7617-7621. DOI: 10.1073/pnas.0700440104
13. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. J Food Sci. 2007;72:M310-M315. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00479.x
14. Schnupf P, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysine. Microbes Infect. 2007;9(10):1176-1187. DOI: 10.1016/j.micinf. 2007.05.005
15. Becattini S, Littmann ER, Carter RA. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. J Exp Med. 2017;214(N):1973-1989. DOI: 10.1084/jem.20170495
16. Louria DB, Hensle T, Armstrong D, Collins HS. Listeriosis complicating malignant disease. A new association. Ann Intern Med. 1967;67(2):260-281. DOI: 10.7326/0003-4819-67-2-261
17. Jurado RL, Farley MM, Pereira E, Harvey RC. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis. 1993;17(2):224-227. DOI: 10.1093/clinids/17.2.224
18. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis. 2008;14(5):734-740. DOI: 10.3201/eid1405.071395
19. Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany-epidemiological patterns 2001–2005. Euro Surveill. 2006;11(6):85-88.
20. Southwick FS, Purich DL. Intracellular pathogenesis of listeriosis. N Engl J Med. 1996;334(12):770-776. DOI: 10.1056/NEJM199603213341206
21. Orsi RH, Bakker HCD, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microbiol. 2011;301(2):79-796.
22. Pizarro-Cerda J, Kuhbacher A, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. Cold Spring Harbor Perspect Med. 2012;11:a010009. DOI: 10.1101/cshperspect.a010009
23. Gaillard JL, Berche P, Mounier J. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. Infect Immun. 1987;55(10):2822-2829. DOI: 10.1128/IAI.55.11.2822-2829.1987
24. Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. Infect Immun. 1995;63(11):4231-4237. DOI: 10.1128/IAI.63.11.4231-4237.1995
25. de Almeida RN, Chesca AC, da Silva AD, Cecilia E. Antimicrobial sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from beef. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal. 2018;12.
26. Noll M, Kleta S, Al Dahouk S. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany Journal of Infection and Public Health. 2018;11(4):572-577. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.12.007
27. Conter M, Paludi D, Zanardi E. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 2009;128,(3):497-500. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.018
28. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Microbiol Infect. 2010;16(1):16-23. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x
29. Davis JA, Jackson CR. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. Microb Drug Resist. 2009;15(1):27-32. DOI: 10.1089/mdr.2009.0863
30. Azimi PH, Koranyi K, Lindsey KD. *Listeria monocytogenes*: synergistic effects of ampicillin and gentamicin. Am J Clin Pathol. 1979;72:974-977. DOI: 10.1093/ajcp/72.6.974
31. Moellering Jr RC, Medoff G, Leech I. Antibiotic synergism against *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 1972;1(1):30-34. DOI: 10.1128/aac.1.1.30
32. Nairn K, Shepherd GL, Edwards JR. Efficacy of meropenem in experimental meningitis. J Antimicrob Chemother. 1995;36(SupplA):73-84. DOI: 10.1093/jac/36.suppl_a.73
33. Carryn S, Van B.F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Activity of β -lactams (ampicillin, meropenem), gentamicin, azithromycin and moxifloxacin against intracellular *Listeria monocytogenes* in a 24 h THP-1 human macrophage model. J Antimicrob Chemother. 2003;51(Iss.4):1051-1052. DOI: 10.1093/jac/dkg189
34. Hawkins E, Bortolussi R, Issekutz AC. *In vitro* and *in vivo* activity of various antibiotics against *Listeria monocytogenes* type 4b. Clin Invest Med. 1984(7):335-341.
35. Thonnings S, Knudsen JD, Schønheyder HC, Søgaard M, Ostergaard C, Arpi M, et al. Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia. Clin Microbiol Infect. 2016 Aug;22(8):725-30. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.06.006
36. Methodological recommendations No 11 of 2001 Listeriosis: approved by the Chairman of the Health Committee on April 04, 2001: developed by the Infectious Clinical Hospital No 1 of the Health Committee, MGMSU, M.P. Chumakov IPVI RAMS. (In Russian).
37. Strachunsky LS, Belousova Yu B, Kozlova SN. Practical guide to anti-infective chemotherapy. Edited by Strachunsky LS. 2002, 381 p. (In Russian).
38. Audurier A, Pardon P, Marly J, Lantier F. Experimental infection of mice with *L. monocytogenes* and *L. innocua*. Ann Microbiol. 1980;131B(1):47-57.
39. Golnazarian CA, Donnelly CW, Pintauro SJ, Howard DB. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57b1/6j mice. J Food Prot. 1989;52(10):696-701. DOI: 10.4315/0362-028X-52.10.696
40. Czuprynski CJ, Faith NG, Steinberg H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. Infect Immun. 2003;71(2):682-689. DOI: 10.1128/IAI.71.2.682-689.2003
41. Bergmann S, Beard PM, Pasche B, Lienenklaus S, Weiss S, Gahan CG. Influence of internalin A murinisation on host resistance to orally acquired listeriosis in mice. Microbiol. 2013;13(90):2-16. DOI: 10.1186/1471-2180-13-90
42. Ermolaeva SA. The role of systemic regulation of pathogenicity gene expression in *Listeria monocytogenes* virulence. Diss. Moscow, 2004, 44 p. (In Russian).
43. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Effectiveness of bacteriophage Pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice. Bacteriology. 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24 (In Russian).
44. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Abaev IV. Effektivnost' bakteriofaga SA18 pri lechenii eksperimental'noi stafilokokkovoi infektsii u myshei linii BALB/s. Russian Journal of Infection and Immunity. 2017;5:906. (In Russian).
45. Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Evaluation of preventive and therapeutic

- efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_Kpnp_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. *Bacteriology*. 2017;2(1):73-77. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77 (In Russian).
46. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. *Bacteriology*. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
47. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Denisenko EA, Verevkin VV, Ganina EA, Volozhantsev NV. Phage therapy efficiency of experimental escherichiosis infection in mice. *Bacteriology*. 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22 (In Russian).
48. Volozhantsev NV, Borzilov AI, Komisarova EV, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Shpirt AM, et al. Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. *Antibiotics* (Basel). 2020 Oct 25;9(11):732. DOI: 10.3390/antibiotics9110732.
49. Bou Ghanem EN, Jones GS, Myers-Morales T, Patil PN, Hidayatullah AN, D'Orazio SEF. Inla promotes dissemination of *Listeria monocytogenes* to the mesenteric lymph nodes during food borne infection of mice. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1003015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003015
50. Hof H, Emmerling P. Murine Model for Therapy of Listeriosis in the Compromised Host. III. The Effect of Rifampicin. *Chemotherapy*. 1984;30:125-130. DOI: 10.1159/000238258
51. Altimira J, Prats N, Lopez S, Domingo M, Briones V, Dominguez L, Marco A. Repeated oral dosing with *Listeria monocytogenes* in mice as a model of central nervous system listeriosis in man. *J Comp Pathol*. 1999;121:117-125. DOI: 10.1053/jcpa.1999.0303
52. Guskova TA. Toxicology of medical preparations. Moscow, 2003, 153 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Перескокова Евгения Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Olga V. Korobova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Tatiana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

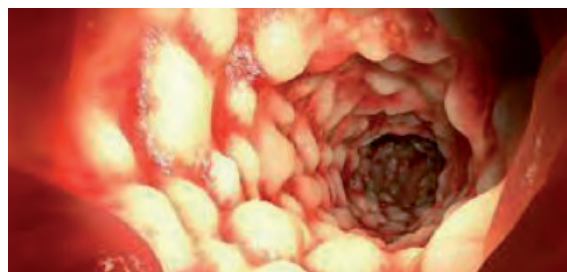
Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Elena A. Ganina, Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Клетки кишечника и молочнокислые бактерии совместно защищают от кандидоза

Дисбактериоз кишечной микробиоты может инициировать чрезмерный рост симбиотических видов *Candida* – основного predisposing фактора к диссеминированному кандидозу. Комменсальные бактерии, такие как *Lactobacillus rhamnosus*, могут противодействовать патогенности *Candida albicans*. Исследовано взаимодействие между *C. albicans*, *L. rhamnosus* и эпителиальными клетками кишечника путем интеграции транскрипционного и метаболического профилирования и обратной генетики. Нецелевая метаболомика и моделирование *in silico* показывают, что эпителиальные клетки кишечника метаболически способствуют росту бактерий, что приводит к выработке бактериями противовирусных соединений. Кроме того, рост бактерий изменяет метаболическую среду, включая удаление излюбленных источников питательных веществ *C. albicans*. Это сопровождается транскрипционными и метаболическими изменениями у *C. albicans*, включая измененную экспрессию генов, связанных с вирулентностью. Наши результаты показывают, что колонизация кишечника бактериями может противодействовать *C. albicans*, изменяя метаболическую среду, вызывая метаболические адаптации, которые снижают патогенность грибов.



Alonso-Roman R, Last A, Mirhakkak MH, et al. *Lactobacillus rhamnosus* colonisation antagonizes *Candida albicans* by forcing metabolic adaptations that compromise pathogenicity. *Nat Commun*. 2022;13:3192. DOI: 10.1038/s41467-022-30661-5

Использование молекулярного метода для идентификации возбудителя паратифа В

Л.А.Кафтырева^{1,2}, С.А.Егорова¹, О.А.Каменева³, К.Г.Косякова^{2,3}, А.О.Шапарь⁴,
Р.В.Кицбашвили⁴, Н.С.Каменева⁵

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

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³ГБУЗ «Детская городская больница №22», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

⁵ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Лабораторная диагностика паратифа В требует использования дополнительных методов идентификации возбудителя, поскольку серovar *Salmonella* Paratyphi В с антигенным комплексом 1,4,5,12:b:1,2 включает два биологических варианта, различающихся по способности ферментировать d-тарtrate. Заболевания, вызванные штаммами двух биоваров, имеют значительные эпидемиологические и патогенетические особенности. Тифоподобное заболевание вызывают штаммы биовара dT⁺. В рутинной практике лабораторий для дифференциации используют биохимический тест с ацетатом свинца. Оценка результата теста носит субъективный характер, не всегда воспроизводима и требует до 6 дней инкубации посевов. Цель нашего исследования заключалась в оценке молекулярного метода, предложенного В. Malorny et al. (2003) для дифференциации d-тарtrate-положительных и -отрицательных биоваров *S. Paratyphi* В. Изучено 15 штаммов *S. Paratyphi* В: 14 штаммов, выделенных от пациентов с гастроэнтеритом, по результатам полимеразной цепной реакции относились к биовару dT⁺, один штамм – от пациента с тифоподобным заболеванием – к биовару dT⁻, истинному возбудителю паратифа В. Результаты молекулярной идентификации подтверждались эпидемиологическими и клиническими данными. Молекулярные методы позволяют преодолеть проблемы, связанные с постановкой фенотипических тестов, и должны стать методами выбора для быстрой и достоверной идентификации сложнотипируемых штаммов *Salmonella*, вызывающих спорадические или групповые случаи сальмонеллезов.

Ключевые слова: *Salmonella Paratyphi* В, d-тарtrate, паратиф В, биовар, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Каменева О.А., Косякова К.Г., Шапарь А.О., Кицбашвили Р.В., Каменева Н.С. Использование молекулярного метода для идентификации возбудителя паратифа В. Бактериология. 2022; 7(2): 22–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-22-27

Using the molecular method for identification of the paratyphus В pathogen

L.A.Kaftyreva^{1,2}, S.A.Egorova¹, O.A.Kameneva³, K.G.Kosyakova^{2,3}, A.O.Shapar⁴,
R.V.Kitsbabashvili⁴, N.S.Kameneva⁵

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, St. Petersburg, Russian Federation;

²I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

³Children's City Hospital No 22, St. Petersburg, Russian Federation;

⁴Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg», St. Petersburg, Russian Federation;

⁵St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Для корреспонденции:

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора; профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Телефон: (812) 233-0856
E-mail: kafldia@mail.ru

Статья поступила 26.05.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Lidia A. Kaftyreva, MD, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Enteric Infections, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор; Professor of the Department of Medical Microbiology, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University

Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation
Phone: (812) 233-0856
E-mail: kafldia@mail.ru

The article was received 26.05.2022, accepted for publication 30.06.2022

Laboratory diagnostics of paratyphi B requires the use of additional methods for pathogen identification, since *Salmonella* Paratyphi B serovar (antigen complex 1,4,5,12:b:1,2) includes two biological variants that differ in their ability to d-tartrate fermentation. Diseases caused by strains of these two biovars have significant epidemiological and pathogenetic features, typhoid-like disease is caused by dT⁻ strains. In the routine laboratory practice a biochemical lead acetate test is used for differentiation, but the test result evaluation is subjective, not always reproducible and requires up to 6 days of incubation. The aim of our study was to evaluate the molecular method proposed by B. Malorny et al. (2003) for the differentiation of d-tartrate-positive and negative biovars of *S. Paratyphi* B. 15 strains of *S. Paratyphi* B were studied: 14 strains isolated from patients with salmonella gastroenteritis, according to polymerase chain reaction, belonged to dT⁺ biovar; one strain from a patient with typhoid-like disease – to dT⁻ biovar, the true causative agent of paratyphi B. Thus, the results of molecular identification are consistent with epidemiological and clinical data. Molecular methods overcome the problems of phenotypic testing and should be the methods of choice for rapid and reliable identification of *Salmonella* strains that cause sporadic or group cases of salmonellosis.

Key words: *Salmonella Paratyphi* B, d-tartrate, paratyphi B, biovar, polymerase chain reaction

For citation: Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Kameneva O.A., Kosyakova K.G., Shapar A.O., Kitsbabashvili R.V., Kamenev N.S. Using the molecular method for identification of the paratyphi B pathogen. *Bacteriology*. 2022; 7(2): 22–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-22-27

S *Salmonella enterica* subsp. *enterica* включает четыре серовара, способных вызывать тифоподобные заболевания у человека. К ним относят возбудителя брюшного тифа *S. Typhi* и возбудителей паратифов *S. Paratyphi* A, *S. Paratyphi* B и *S. Paratyphi* C. В международной классификации болезней (МКБ-10) каждому из перечисленных заболеваний присвоен конкретный код (A01.0, A01.1, A01.2, A01.3 соответственно), в отличие от кишечных инфекций и пищевых отравлений, вызванных бактериями *Salmonella* других сероваров (код A02).

Лабораторная диагностика сальмонеллеза включает выделение чистой культуры возбудителя из биологического материала, идентификацию до вида *Salmonella enterica* subsp. *enterica* по биохимической активности (в отношении углеводов, спиртов и других субстратов) и определение серологического варианта (серовара) по характеристике комплекса О- и Н-антигенов. В отношении идентификации *S. Paratyphi* B классического алгоритма исследования недостаточно, так как серовар с антигенной формулой 1,4,5,12:b:1,2 включает два биологических варианта, различающихся по способности ферментировать d-тарtrat (право-вращающая соль винной кислоты). До 2001 г. в схеме «Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars» штаммы *Salmonella* с антигенной формулой 1,4,5,12:b:1,2 относили к разным сероварам: штаммы, не ферментирующие d-тарtrat (dT⁻), – к серовару *S. Paratyphi* B; штаммы, ферментирующие d-тарtrat (dT⁺) – к серовару *S. Java* [1]. В 2001 г. серовар *S. Java* официально исключен из схемы. В настоящее время все штаммы *Salmonella* с антигенной формулой 1,4,5,12:b:1,2 относят к серовару *S. Paratyphi* B (включающему биовар dT⁻ и биовар dT⁺). Тем не менее микробиологи и эпидемиологи во многих странах по-прежнему используют название *S. Java* для штаммов *S. Paratyphi* B биовара dT⁺. В Российской Федерации современные изменения схемы «Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars» отражены в методических рекомендациях «Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С» (утверждены Роспотребнадзором 29.12.2007 №0100/13745-07-34). В Методических указаниях «Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды» (МУ 4.2.2723-10) по-прежнему упоминаются два серовара: *S. Java* (биовар dT⁺) и *S. Paratyphi* B (биовар dT⁻).

Деление на биовары имеет эпидемиологическое значение, так как паратиф В (возбудитель – штаммы *S. Paratyphi*

В биовара dT⁻) является антропонозной инфекцией, источник штаммов возбудителя – человек, заболевание протекает чаще как генерализованная тифоподобная инфекция.

Штаммы *S. Paratyphi* B биовара dT⁺ (старое название *S. Java*) характеризуются меньшей вирулентностью для человека, вызывают гастроэнтерит (генерализованная инфекция развивается редко), источниками штаммов являются животные. По литературным данным, штаммы *S. Paratyphi* B биовара dT⁺ выделяют значительно чаще, чем таковые биовара dT⁻ [2–4]. Зарегистрированы многочисленные вспышки, вызванные контаминированными пищевыми продуктами. Во Франции в 1993 г. 273 человека заболели в результате употребления козьего сыра, сделанного из непастеризованного молока [5]. В 2000-х гг. были зарегистрированы вспышки сальмонеллеза в Дании, Бельгии, Шотландии, Швеции, Канаде и Великобритании, вызванные употреблением контаминированных листьев салата, куриного мяса, а также вследствие контакта человека с черепахами и аквариумными рыбками [6–8]. Описаны две ведущие клональные линии *S. Paratyphi* B биовара dT⁺. Штаммы первой линии выделяли из мяса кур в Нидерландах в 2000–2004 гг., и вследствие импорта куриного мяса возникали вспышки в других европейских странах [9, 10]. Штаммы второй генетической линии характеризуются множественной устойчивостью к антимикробным препаратам (ампициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, спектиномицину, сульфаниламидам и тетрациклину), вызывают спорадические заболевания человека, отмечены случаи выделения от аквариумных рыбок и телят [6, 8, 11–13].

Учитывая значительные эпидемиологические различия заболеваний, вызванных двумя биоварами *S. Paratyphi* B, во избежание диагностических ошибок в случае выделения штамма с антигенной формулой 1,4,5,12:b:1,2 в лаборатории необходимо определять биовар по отношению к d-тартрату. G. Alfredsson et al. (1972) предложили биохимический тест с ацетатом свинца для дифференциации dT⁻ и dT⁺-штаммов *Salmonella*, который с небольшими модификациями (увеличение посевной дозы, времени и условий инкубации) используют в различных странах как золотой стандарт [14, 15]. Также существует коммерческий агар Remel Jordan's Tartrate Agar (ThermoFisher) для оценки ферментации d-тартрата штаммами энтеробактерий, недоступный в Российской Федерации. Таким образом, дифференциация биоваров в рутинной практике требует постановки дополнительных био-

химических тестов и не менее 6 дней для получения достоверного результата.

Цель исследования заключалась в оценке молекулярного метода для дифференциации биоваров *S. Paratyphi B* (d-тарtrat-положительный и d-тарtrat-отрицательный) при лабораторной диагностике паратифа В.

Материалы и методы

Изучены 15 штаммов *S. Paratyphi B* из коллекции референс-центра по мониторингу возбудителя брюшного тифа ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, выделенные в 2008–2019 гг. на административных территориях РФ из проб фекалий пациентов с гастроэнтеритом (14 штаммов биовар dT⁺) и крови пациента с тифоподобным течением сальмонеллезной инфекции (1 штамм биовар dT⁻). Видовую реидентификацию штаммов проводили с использованием бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMerieux), определение антигенной структуры – в реакции агглютинации с сыворотками диагностическими сальмонеллезными адсорбированными к О- и Н-антигенам сальмонелл ПЕТСАЛ производства СПбНИИВС (Россия). Для определения способности штамма *Salmonella* к расщеплению d-тартрата использовали тест с ацетатом свинца [16].

Для дифференциации биоваров *S. Paratyphi B* молекулярным методом использовали метод, предложенный В. Malorny et al. (2003) и модифицированный Н. Levy et al. (2008) [4, 15]. Метод основан на том, что в геноме штаммов *Salmonella* присутствует ген *STM3356*, кодирующий катионный транспортер, способствующий росту *Salmonella* в присутствии d-тартрата. У штаммов *Salmonella*, не ферментирующих d-тарtrat (dT⁻), в стартовом кодоне гена *STM3356* присутствует однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism/SNP) ATG→ATA, поэтому трансляции катионного транспортера не происходит. Детекция участка гена, включающего стартовый кодон ATG, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами позволяет дифференцировать штаммы двух биоваров. Бактериальную ДНК выделяли с помощью реагента InstaGen Matrix (BioRad, США) согласно инструкции производителя. Использовали две пары праймеров: для идентификации стартового кодона ATG – праймеры dT⁺-for и dT⁺-rev; для внутреннего контроля амплификации и выявления ложноотрицательных результатов, вызванных ингибиторами ПЦР, – праймеры P1 и P2 (таблица) [3].

Мишень	Последовательность (5'–3')	Название и размер ампликона
Кодон ATG	dT ⁺ -for: GTAAGGGTAATGGGTTC dT ⁺ -rev: ACATTATCGCTCAATGGAG	dT: 289 bp
Внутренний контроль амплификации	P1: TTATTAGGATCGGCCAGGC P2: AAAGAATAACCGTTGTTAC	oriC: 163 bp

ПЦР-смесь включала (25 µl): Taq Master mix green HS (Алкор Био, РФ) – 12,5 µl; по 0,2 µM праймеров (по 0,5 µl праймера в стоковой концентрации 10 µM); H₂O – 10,5 µl; ДНК – 1,0 µl. Условия ПЦР: начальная инкубация 15 мин при 95°C; 30 циклов – денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при

55°C, элонгация 30 с при 72°C; финальная элонгация – 5 мин при 72°C. Для постановки ПЦР использовали амплификатор C1000 (BioRad, США). Амплифицированные фрагменты идентифицировали путем электрофореза в 0,5X-растворе TBE и 2%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 120 V в течение 45 мин, визуализировали с использованием системы гель-документирования Gel Doc (BioRad, США). В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК-маркер «100 bp +1,5 Kb +3 Kb» (SibEnzyme, РФ).

Результаты и обсуждение

Изученные штаммы относились к *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, характеризовались типичными биохимическими свойствами: ферментация глюкозы с образованием кислоты и газа, отсутствие ферментации лактозы и сахарозы, продукция сероводорода, утилизация цитрата, отрицательный ONPG-тест, наличие лизиндекарбоксилазы и орнитиндекарбоксилазы, отсутствие продукции индола, отсутствие уреазы, положительная реакция с метиловым красным и отрицательная реакция Фогеса–Проскауэра. Штаммы имели антигенный комплекс: О-антигены 1, 4, 5 и 12; Н-антигены b и 1, 2 и относились к серовару *S. Paratyphi B* (антигенная формула 1,4,5,12:b:1,2). Определение биовара штаммов по способности ферментировать d-тарtrat в тесте с ацетатом свинца заняло 6 суток. Однозначный результат получен не для всех штаммов.

При постановке ПЦР с электрофоретической детекцией у всех штаммов амплифицирован контрольный фрагмент oriC (163 bp), специфический для бактерий рода *Salmonella*, что свидетельствовало об отсутствии ложноотрицательных реакций при постановке ПЦР. У 14 штаммов выявлен специфический фрагмент dT (289 bp), свидетельствующий о наличии стартового кодона ATG в гене *STM3356* (рисунок).

Наличие фрагмента dT свидетельствовало о принадлежности штаммов к варианту *S. Paratyphi B* dT⁺ (ранее называемому *S. Java*). Один штамм, выделенный из крови пациента с тифоподобным течением сальмонеллезной инфекции, не имел специфического фрагмента dT, что указывало на принадлежность к биовару *S. Paratyphi B* dT⁻, истинному возбудителю паратифа В.

В РФ определение биовара *S. Paratyphi B* регламентировано МР «Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С» и МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды». В рутинной лабораторной практике для определения способно-

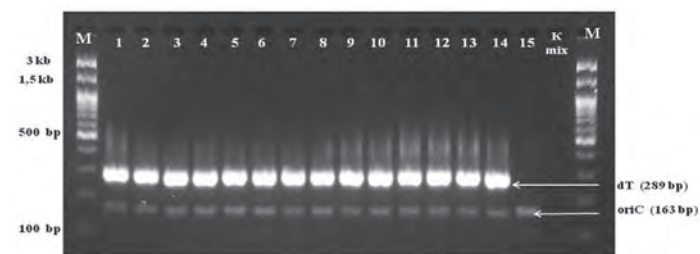


Рисунок. Электрофореграмма результатов ПЦР: М – маркер молекулярного веса (100 bp + 1,5 kb + 3 kb); K_{mix} – контроль чистоты ПЦР-смеси; 1–14 – штаммы *S. Paratyphi* dT⁺; 15 – штамм *S. Paratyphi* dT⁻.

сти штамма *Salmonella* к расщеплению d-тартрата используется тест с ацетатом свинца [16]. В пробирки с 3–4 мл среды (1%-й пептонный раствор с 1% d-тартрата и индикатором бромтимоловым синим, pH 7,4) засевают петлей 18–20-часовую бульонную или агаровую культуру и инкубируют 14 дней при 37°C (в зарубежных источниках срок инкубации составляет 6 дней). Результаты учитывают ежедневно по изменению цвета среды, а также по величине осадка, выпавшего через 30 мин после добавления 0,5 мл насыщенного водного раствора ацетата свинца. При положительном результате реакции (штамм биовара dT⁺) содержимое пробирки меняет цвет с голубого на зеленовато-желтый, а затем белый, величина осадка после добавления ацетата свинца незначительная, не превышает объема среды в пробирке. При отрицательном результате (штамм биовара dT⁻) голубой цвет сохраняется, а после добавления ацетата свинца выпадает объемный осадок, занимающий более объема среды. Для обеспечения возможности учета результата реакции в разные сроки штамм засевают в несколько пробирок, что требует дополнительного расхода среды. В то же время многие авторы отмечают, что оценка результата теста с ацетатом свинца вызывает затруднения, носит субъективный характер и не всегда воспроизводима [2, 15, 17].

Поскольку в РФ штаммы *S. Paratyphi B* выделяют редко, а также учитывая небольшой срок хранения готовой среды, необходимость использования реагентов, зарегистрированных для медицинских целей, и контрольных штаммов, это исследование становится достаточно дорогостоящим и трудоемким для рутинного использования в бактериологических лабораториях.

На территории Северо-Западного федерального округа в 2010–2020 гг. зарегистрированы единичные случаи сальмонеллеза, вызванного *S. Paratyphi B* биовара dT⁻, в Санкт-Петербурге – в 2010, 2012 и 2013 гг. (по 1 случаю), 2015 и 2016 гг. (по 2 случая), 2018 г. (один случай). Заболевание сальмонеллезом, обусловленным *S. Java*, отмечено в 2015 г. Во всех случаях время подтверждения биовара после видовой и антигенной идентификации превышало 5 суток, при этом визуализация результата ферментации d-тартрата в тесте с ацетатом свинца была нечеткой. С позиций доказательной медицины этот тест не может рассматриваться как достоверный.

В 2003 г. B. Malorny et al. предложили молекулярный тест для выявления способности штаммов *Salmonella* утилизировать d-тарtrat [15]. В дальнейшем работами многих исследователей на большом количестве штаммов было показано полное совпадение результатов молекулярного метода и теста с ацетатом свинца [2, 4, 15, 17]. В нашем исследовании результаты молекулярной идентификации подтверждались эпидемиологическими и клиническими данными: 14 штаммов от пациентов с сальмонеллезным гастроэнтеритом по результатам ПЦР относились к биовару dT⁺ (ранее называемый серовар *S. Java*), один штамм от пациента с тифоподобным заболеванием – к биовару dT⁻, истинному возбудителю паратифа В. Продолжительность молекулярного исследования методом ПЦР с электрофоретической детекцией составила около 3 ч по сравнению с 6 сутками, необходимыми для достоверного учета результатов классического теста с ацета-

том свинца. Проведенное нами исследование подтвердило, что молекулярные методы позволяют преодолеть проблемы, связанные с постановкой фенотипических тестов, и должны стать методами выбора для быстрой и достоверной идентификации сложнотипируемых штаммов *Salmonella*, вызывающих спорадические или групповые случаи сальмонеллезов.

Филогенетические исследования подтверждают обоснованность используемого в настоящее время фенотипического деления штаммов серовара *S. Paratyphi B* по способности ферментировать d-тарtrat. При изучении генома штаммов *Salmonella enterica* spp. *enterica* с общей антигенной формулой 1,4, 5,12:b:1,2 классическим методом MSLT обнаружено, что этот серовар включает не менее 10 филогенетических групп, объединяющих 23 сиквенс-типа различной степени филогенетической близости. Штаммы *S. Paratyphi B* dT⁻ (имеющие специфический SNP в гене *STM3356*), вызывающие тифоподобное заболевание, принадлежат только к филогенетической группе PG1, сиквенс-типу ST86. Высказано предположение, что для штаммов других сиквенс-типов *S. Paratyphi B* идентичная антигенная формула является результатом случайных рекомбинаций в хромосомном локусе, отвечающем за синтез H-антигена 1-й и 2-й фазы [18]. Дальнейшее изучение полного генома штаммов серовара *S. Paratyphi B* позволит выявить отличия в патогенном потенциале штаммов биовара dT⁻, которые обуславливают инвазивный патогенез вызываемой ими инфекции.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars [Электронный ресурс]. 9th edition. 2007, 167 p. Режим доступа: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf
2. Ahmad N, Hoon ST, Ghani MK, Tee KY. The discrimination of d-tartrate positive and d-tartrate negative *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B isolated in Malaysia by phenotypic and genotypic methods. *Malays J Pathol*. 2012 Jun;34(1):35-9.
3. Threlfall EJ. *Salmonella*. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edition, part VI. Editors: Borriello SP, Murray PR, Funke G. Publishers: Hodder Arnold (London), 2005. pp 1398-1434.
4. Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, et al. PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* Isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1861-6. DOI: 10.1128/JCM.00109-08
5. Desenclos JC, Bouvet P, Benz-Lemoine E, Grimont F, Desqueyroux H, Rebire I, Grimont PA. Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B infection

- caused by a goats' milk cheese, France, 1993: a case finding and epidemiological study. *BMJ*. 1996;312:91 DOI: 10.1136/bmj.312.7023.91
6. Denny J, Threlfall J, Takkinen J, Lofdahl S, Westrell T, Varela C, et al. Multinational *Salmonella* Paratyphi B variant Java (*Salmonella* Java) outbreak, August–December 2007. *Euro Surveill*. 2007 Dec 20;12(12):E071220.2. DOI: 10.2807/esw.12.51.03332-en
 7. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles – United States, 2007–2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008;57:69–72. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5703a3.htm>
 8. Gaulin C, Vincent C, Alain L, Ismail J. Outbreak of *Salmonella* Paratyphi B linked to aquariums in the province of Quebec, 2000. *Can Commun Dis Rep*. 2002 Jun 1;28(11):89–93, 96.
 9. Van Pelt W, van der Zee H, Wannet WJ, van de Giessen AW, Mevius DJ, Bolder NM, et al. Explosive increase of *Salmonella* Java in poultry in the Netherlands: consequences for public health. *Euro Surveill*. 2003 Feb;8(2):31–5. DOI: 10.2807/esm.08.02.00398-en
 10. Brown D, Mather H, Browning L, Coia J. Investigation of human infections with *Salmonella enterica* serovar Java in Scotland and possible association with imported poultry. *Euro Surveill*. 2003;8(2):35–40. DOI: 10.2807/esm.08.02.00399-en
 11. Miko A, Guerra B, Schroeter A, Dorn C, Helmuth R. Molecular characterization of multiresistant d-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3184–91. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3184-3191.2002
 12. Weill FX, Fabre L, Grandry B, Grimont PA, Casin I. Multiple-antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring *Salmonella* genomic islands 1, 1-B, and 1-C. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2793–801. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2793-2801.2005
 13. Evans SJ, Davies RH, Binns SH, Liebana E, Jones TW, Millar MF, et al. Multiple antimicrobial resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B variant Java in cattle: a case report. *Vet Rec*. 2005; 156(11):343–6. DOI: 10.1136/vr.156.11.343
 14. Alfredsson GA, Barker RM, Old DC, Duguid JP. Use of tartaric acid isomers and citric acid in the biotyping of *Salmonella* Typhimurium. *J Hyg (Lond)*. 1972 Dec;70(4):651–66. DOI: 10.1017/s0022172400022518
 15. Malorny B, Bunge C, Helmuth R. Discrimination of d-Tartrate-Fermenting and -Nonfermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates by Genotypic and Phenotypic Methods. *Clin Microbiol*. 2003;41(9):4292–7. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4292-4297.2003
 16. Методические указания «Лабораторная диагностика сальмонеллезов». Утв. зам. нач. Глав. сан.-эпид. управления МЗ РСФСР 02.01.1974.
 17. Gand M, Mattheus W, Saltykova A, Roosens N, Dierick K, Marchal K, et al. Development of a real-time PCR method for the genosero-typing of *Salmonella* Paratyphi B variant Java. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Jun;103(12):4987–4996. DOI: 10.1007/s00253-019-09854-4
 18. Connor TR, Owen SV, Langridge G, Connell S, Nair S, Reuter S, Dallman TJ, et al. What's in a name? Species-wide whole-genome sequencing resolves invasive and noninvasive lineages of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B. *mBio*. 2016 Aug 23;7(4):e00527-16. DOI: 10.1128/mBio.00527-16
 3. Threlfall EJ. *Salmonella*. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edition, part VI. Editors: Borriello SP, Murray PR, Funke G. Publishers: Hodder Arnold (London), 2005. pp 1398–1434.
 4. Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, et al. PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* Isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1861–6. DOI: 10.1128/JCM.00109-08
 5. Desenclos JC, Bouvet P, Benz-Lemoine E, Grimont F, Desqueyroux H, Rebire I, Grimont PA. Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B infection caused by a goats' milk cheese, France, 1993: a case finding and epidemiological study. *BMJ*. 1996;312:91 DOI: 10.1136/bmj.312.7023.91
 6. Denny J, Threlfall J, Takkinen J, Lofdahl S, Westrell T, Varela C, et al. Multinational *Salmonella* Paratyphi B variant Java (*Salmonella* Java) outbreak, August–December 2007. *Euro Surveill*. 2007 Dec 20;12(12):E071220.2. DOI: 10.2807/esw.12.51.03332-en
 7. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles – United States, 2007–2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008; 57:69–72. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5703a3.htm>
 8. Gaulin C, Vincent C, Alain L, Ismail J. Outbreak of *Salmonella* Paratyphi B linked to aquariums in the province of Quebec, 2000. *Can Commun Dis Rep*. 2002 Jun 1;28(11):89–93, 96.
 9. Van Pelt W, van der Zee H, Wannet WJ, van de Giessen AW, Mevius DJ, Bolder NM, et al. Explosive increase of *Salmonella* Java in poultry in the Netherlands: consequences for public health. *Euro Surveill*. 2003 Feb;8(2):31–5. DOI: 10.2807/esm.08.02.00398-en
 10. Brown D, Mather H, Browning L, Coia J. Investigation of human infections with *Salmonella enterica* serovar Java in Scotland and possible association with imported poultry. *Euro Surveill*. 2003;8(2):35–40. DOI: 10.2807/esm.08.02.00399-en
 11. Miko A, Guerra B, Schroeter A, Dorn C, Helmuth R. Molecular characterization of multiresistant d-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3184–91. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3184-3191.2002
 12. Weill FX, Fabre L, Grandry B, Grimont PA, Casin I. Multiple-antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring *Salmonella* genomic islands 1, 1-B, and 1-C. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2793–801. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2793-2801.2005
 13. Evans SJ, Davies RH, Binns SH, Liebana E, Jones TW, Millar MF, et al. Multiple antimicrobial resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B variant Java in cattle: a case report. *Vet Rec*. 2005; 156(11):343–6. DOI: 10.1136/vr.156.11.343
 14. Alfredsson GA, Barker RM, Old DC, Duguid JP. Use of tartaric acid isomers and citric acid in the biotyping of *Salmonella* Typhimurium. *J Hyg (Lond)*. 1972 Dec;70(4):651–66. DOI: 10.1017/s0022172400022518
 15. Malorny B, Bunge C, Helmuth R. Discrimination of d-Tartrate-Fermenting and -Nonfermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates by Genotypic and Phenotypic Methods. *Clin Microbiol*. 2003;41(9):4292–7. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4292-4297.2003
 16. Methodological guidelines "Laboratory diagnostics of salmonellosis". Approved by Deputy head Glav san.-epid. management of the Ministry of Health of the RSFSR 02.01.1974. (In Russian).
 17. Gand M, Mattheus W, Saltykova A, Roosens N, Dierick K, Marchal K, et al. Development of a real-time PCR method for the genosero-typing of *Salmonella* Paratyphi B variant Java. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Jun;103(12):4987–4996. DOI: 10.1007/s00253-019-09854-4
 18. Connor TR, Owen SV, Langridge G, Connell S, Nair S, Reuter S, Dallman TJ, et al. What's in a name? Species-wide whole-genome sequencing resolves invasive and noninvasive lineages of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B. *mBio*. 2016 Aug 23;7(4):e00527-16. DOI: 10.1128/mBio.00527-16

References

Информация об авторах:

Егорова Светлана Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора

Каменева Ольга Анатольевна, заведующая централизованной специализированной бактериологической лабораторией ГБУЗ «Детская городская больница №22»

Косякова Карина Георгиевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России; врач-бактериолог централизованной специализированной бактериологической лаборатории ГБУЗ «Детская городская больница №22»

Шапарь Александр Олегович, заведующий отделом эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии с группой учета и регистрации инфекционных и паразитарных заболеваний ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург»

Кицбашвили Рамаз Важаевич, врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург»

Каменева Наталья Сергеевна, студентка ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»

Information about authors:

Svetlana A. Egorova, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Enteric Infections, 1 Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Olga A. Kameneva, Head of the Centralized Specialized Bacteriological laboratory Children's City Hospital No 22

Karina G. Kosyakova, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University; Bacteriologist of the Centralized Specialized Bacteriological Laboratory of the Children's City Hospital No 22

Aleksandr O. Shapar, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection with the Group of Accounting and Registration of Infectious and Parasitic Diseases of the Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg

Ramaz V. Kitsbabashvili, epidemiologist of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection of the Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg

Natalia S. Kameneva, student of the St. Petersburg State Pediatric Medical University

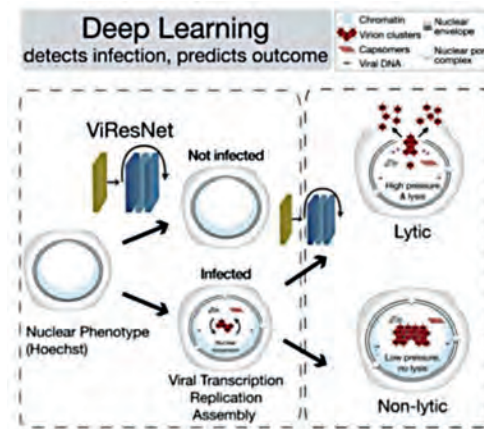
НОВОСТИ НАУКИ**Глубокое обучение при микроскопии предсказывает вирусные инфекции**

Когда вирусы заражают клетку, в ядре клетки происходят изменения, которые можно наблюдать с помощью флуоресцентной микроскопии. Используя флуоресцентные изображения, сделанные на живых клетках, исследователи из Цюрихского университета обучили искусственную нейронную сеть надежно распознавать клетки, инфицированные аденовирусами или вирусами герпеса. Процедура также позволяет выявлять тяжелые острые инфекции на ранней стадии.

У людей аденовирусы могут инфицировать клетки дыхательных путей, а вирусы герпеса – клетки кожи и нервной системы. В большинстве случаев это не приводит к образованию новых вирусных частиц, поскольку вирусы подавляются иммунной системой. Однако аденовирусы и вирусы герпеса могут вызывать стойкие инфекции, которые иммунная система не может полностью контролировать и которые производят вирусные частицы в течение многих лет. Эти же вирусы также могут вызывать внезапные и сильные инфекции, когда пораженные клетки выделяют большое количество вирусов, так что инфекция распространяется быстро. Это может привести к серьезным острым заболеваниям легких или нервной системы.

Исследовательская группа впервые показала, что алгоритм машинного обучения может распознавать клетки, инфицированные герпесом или аденовирусами, исключительно на основе флуоресценции ядра клетки. Этот метод позволяет не только надежно идентифицировать инфицированные вирусом клетки, но и заранее точно определять вирулентные инфекции. Авторы исследования считают, что их разработка может иметь множество применений, в том числе предсказывать реакцию клеток человека на другие вирусы или микроорганизмы. Новый метод открывает новые возможности для лучшего понимания инфекций и открытия новых активных агентов против патогенов, таких как вирусы или бактерии.

Метод анализа основан на сочетании флуоресцентной микроскопии живых клеток с процессами глубокого обучения. Герпес- и аденовирусы, образуемые внутри инфицированной клетки, изменяют организацию ядра, и эти изменения можно наблюдать под микроскопом. Группа обучила алгоритм глубокого обучения – искусственную нейронную сеть – автоматически обнаруживать эти изменения. Сеть обучается с помощью большого набора микроскопических изображений, с помощью которых она учится определять закономерности, характерные для инфицированных или неинфицированных клеток. После завершения обучения и проверки нейронная сеть автоматически обнаруживает инфицированные вирусом клетки.



Andriasyan V, Yakimovich A, Petkidis A, et al.

Microscopy deep learning predicts virus infections and reveals mechanics of lytic-infected cells.
iScience. 2021 May 15;24(6):102543. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102543

Сравнительная оценка питательных сред для выделения сальмонелл из кормов для животных

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

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

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

Представлены результаты сравнительных исследований культурально-морфологических свойств широкого набора питательных сред, предназначенных для выделения сальмонелл из кормов для животных. Показано, что по биологическим показателям при посеве тест-штаммов и изолятов *Salmonella* spp. питательные среды отечественного производителя не уступают, а в некоторых случаях превосходят импортные аналоги. Обнаружено, что высокие показатели производительности и наиболее выраженные дифференцирующие свойства имели такие питательные среды, как XLD-агар, агар Эделя–Кампельмахера, БФЛС-агар, Гектоен-агар.

Ключевые слова: корма для животных, питательные среды, сальмонеллы, дифференцирующие свойства, производительность, селективность

Для цитирования: Кремлева А.А., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Сравнительная оценка питательных сред для выделения сальмонелл из кормов для животных. Бактериология. 2022; 7(2): 28–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-28-33

Comparative evaluation of nutrient media for the isolation of *Salmonella* from animal feed

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

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

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

The results of comparative studies of the cultural and morphological properties of a wide range of nutrient media intended for the isolation of salmonella from feed are presented. It has been shown that according to biological indicators nutrient media of a domestic manufacturer are not inferior, and in some cases are superior to imported analogues for the test-strains and isolates of *Salmonella* spp. It was found that such nutrient media as XLD agar, Edel–Kampelmacher agar, BFLS agar, and Hectoenagar had high performance indicators and the most pronounced differentiating properties.

Key words: animal feed, nutrient media, salmonella, differentiating properties, productivity, selectivity

For citation: Kremleva A.A., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Comparative evaluation of nutrient media for the isolation of *Salmonella* from animal feed. Bacteriology. 2022; 7(2): 28–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-28-33

Корма для животных находятся в начале цепочки безопасности пищевых продуктов в модели «от фермы до прилавка», поэтому анализ пищевых продуктов и кормов на присутствие патогенных микроорганизмов является одним из основных шагов по контролю безопасности продовольственного сырья.

По данным Всемирной организации здравоохранения, сальмонеллы являются основной причиной желудочно-кишечных заболеваний животных и человека [1]. Ежегодно бактерии рода *Salmonella* вызывают более чем 90 млн слу-

чаев энтерита и 105 тыс. смертей [1, 2]. Сальмонеллез является зоонозной болезнью, поэтому мониторинг выделения бактерий рода *Salmonella* из продуктов животного происхождения и кормов имеет важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение.

Стандартизированные классические методы культивирования сальмонелл в настоящее время считаются приоритетными и используются многими ветеринарными лабораториями. Несмотря на стремительное развитие ускоренных методов диагностики (молекулярно-генетические, иммунохрома-

Для корреспонденции:

Кремлева Анна Александровна, научный сотрудник
ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»

Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23

Телефон: (495) 700-0137

E-mail: viktoriya1409@yandex.ru

Статья поступила 06.06.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Anna A. Kremleva, Researcher, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory

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

Phone: (495) 700-0137

E-mail: viktoriya1409@yandex.ru

The article was received 06.06.2022, accepted for publication 30.06.2022

тографические методы, иммуноферментный анализ и др.) различных заболеваний, в качестве основного метода для выделения и подтверждения наличия сальмонелл используется культуральный [2, 3].

Алгоритм исследований при обнаружении и выделении *Salmonella* spp. включает следующие этапы: предварительное обогащение в неселективной жидкой среде, селективное обогащение в жидких средах, пересев на дифференциально-диагностические плотные среды, серологическая и биохимическая идентификация подозрительных на сальмонеллы колоний. Эффективность культурального метода зависит от правильного и адекватного выбора питательных сред, что позволяет определить таксономически значимые признаки выделенных изолятов сальмонелл и правильно их идентифицировать [2–7]. Плотные питательные среды используют для получения чистых культур микроорганизмов с целью изучения культуральных свойств и морфологических признаков.

На территории России при выявлении сальмонелл используется широкий спектр питательных сред как отечественного, так и зарубежного производства, предназначенных для выделения *Salmonella* spp. из различных объектов при санитарно-бактериологических исследованиях: XLD-агар, XLT-4 агар, агар Эделя–Кампельмахера, Brilliante Salmonella Agar, Hektoen Enteric Agar, Гектоен-агар, Salmonella Chromogenic agar (Хромогенный агар для сальмонелл), Rambach Agar, Salmonella Differential Agar Rajhans Medium (Радж–Ханс-агар) и др.

Действующий международный стандарт ISO 6579-1-2017 «Горизонтальный метод обнаружения, подсчета и определения серотипа бактерий рода *Salmonella*» регламентирует применение следующих питательных сред: Ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар), Brilliant Green Agar (Дифференциальный агар с бриллиантовым зеленым модифицированный), Гектоен-агар или агар Уилсона–Блэра [7].

В соответствии с действующими на территории РФ нормативными документами (НД) по выделению сальмонелл из кормов для животных предусмотрено использование минимального набора дифференциально-диагностических питательных сред: висмут-сульфит-агар (BCA), среда Плоскирева и среда Левина [4–6].

Среды Плоскирева и Левина относятся к слабоселективным, и при выделении чистых культур микроорганизмов возникают проблемы из-за присутствия в исследуемых образцах протей, способного к роению. Кроме того, на таких питательных средах при первичном выделении по сочетанию идентичных биохимических признаков можно заподозрить одновременно несколько родов энтеробактерий [3, 8–10].

BCA обладает более выраженными селективными свойствами в отношении сопутствующей микрофлоры, но рост некоторых штаммов сальмонелл можно визуализировать только на 2-е сутки инкубации посевов.

С появлением новых высокоселективных питательных сред, обладающих четкими дифференцирующими свойствами, назрела необходимость актуализировать методологию по исследованию кормов для животных с целью выделения сальмонелл. Применение современных качественных питательных сред при идентификации патогенных микроорганизмов необходимо для соблюдения стандартов безопасности кормов для животных и управления рисками.

Целью исследования явилась сравнительная оценка дифференциально-диагностических питательных сред отечественных и зарубежных производителей при выделении и идентификации сальмонелл из кормов для животных.

Материалы и методы

В работе использованы дифференциально-диагностические и хромогенные питательные среды, предназначенные для выделения сальмонелл различных производителей:

- зарубежных производителей: XLD agar (Xylose Lysine Desoxycholate Agar) Conda Pronadisa (Испания), XLD agar Merck (Германия); XLT-4 agar (BASE) Merck (Германия), селективная добавка XLT agar supplement Merck (Германия), Salmonella Chromogenic agar (Хромогенный агар для сальмонелл) Condalab, Brilliante Salmonella Agar Oxoid, Rambach Agar Merck, Salmonella Differential Agar Rajhans Medium (Радж–Ханс-агар) HiMedia, Hektoen Enteric Agar (агар гектоеновый для энтеробактерий) Condalab [11–15];

- отечественного производителя (ФБУН ГНЦ ПМБ): сахарозо-лактозный агар с бриллиантовым зеленым и феноловым красным (БФЛС-агар), агар Эделя–Кампельмахера, агар Плоскирева ГПМ, висмут-сульфит-ГПМ-агар, питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар), дифференциально-селективная питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл (Гектоен-агар). Неселективный триптон-соевый агар использовали в качестве контрольной питательной среды для подсчета посевной дозы засеянной культуры микроорганизма [12].

Все питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению.

Исследования проводили в соответствии с требованиями действующих НД [4–6]. В ходе сравнительных исследований питательных сред оценивались показатели производительности, селективности, дифференцирующие свойства [16].

В работе использовались тест-штаммы микроорганизмов, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk»: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis 11272, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis var. Kunzendorf 309, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin C96, *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Proteus mirabilis* ATCC 29852 и изоляты сальмонелл, выделенные из кормов: *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *S. Give*, *S. Enteritidis*, *S. Oranienburg*, *S. редких групп*. Для оценки ингибирующих свойств питательных сред были использованы ассоциации (*S. aureus* ATCC 25923 + *E. faecalis* ATCC 19433).

Готовили стандартную взвесь культуры каждого тест-штамма, соответствующую 10 единицам по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85 П), с использованием стерильного 0,9%-го раствора натрия хлорида. Полученные взвеси культур десятикратными разведениями (4,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида с 0,5 мл микробной взвеси) доводили до разведений 10^{-4} – 10^{-6} .

Идентификацию выделенных изолятов сальмонелл проводили методом времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью программного обеспечения

FlexControl (Bruker Daltonik, Германия), биохимическую типизацию изолятов энтеробактерий – с помощью стрипов API 20E.

Серологическую группу выделенных культур сальмонелл определяли в реакции агглютинации сыворотками диагностическими адсорбированными для РА ПЕТСАЛ® производства ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов». Серологический вариант штамма определяли в соответствии со схемой Кауфмана–Уайта.

Результаты и обсуждение

Известно, что сальмонеллез животных, вызываемый серотипами *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, занимает ведущее значение среди других серотипов сальмонелл во многих странах мира, в том числе и в России [1, 2]. Согласно действующим на территории РФ НД по исследованию кормов и кормовых добавок, кишечная палочка также является одним из главных показателей контроля качества и безопасности. Среди бактериальных болезней животных *E. coli* является одним из основных возбудителей инфекционных болезней животных, в частности молодняка [17].

На первом этапе исследований была проведена сравнительная оценка дифференциально-диагностических свойств питательных сред отечественных и зарубежных производителей при посеве тест-штаммов сальмонелл и *E. coli*.

После инкубации посевов в термостате в течение 18–24 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ визуально проводили морфологическую оценку всех выросших колоний. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Результаты биологических показателей испытываемых питательных сред для выделения бактерий рода *Salmonella* на тест-штаммах представлены в таблице.

Из таблицы видно, что на всех изученных питательных средах отмечался характерный рост тест-штаммов сальмонелл и отсутствие роста грамположительных микроорганизмов. При оценке культурально-морфологических свойств выросших колоний и дифференцирующих свойств каждой питательной среды было установлено, что питательные среды XLD-агар (всех производителей), XLT-4 agar, Salmonella Chromogenic agar, Brilliance Salmonella Agar, Hektoen Enteric Agar, Rambach Agar, Salmonella Differential Agar, Rajhans Medium, Гектоен-агар, БФЛС-агар, агар Эделя–Кампельмахера обладают четкими дифференцирующими свойствами и характерной морфологией.

Бактерии сальмонелл, продуцирующие в процессе роста сероводород, на питательных средах XLD-агар (всех производителей), XLT-4 agar, Гектоен-агар, Hektoen Enteric Agar формировали колонии с черным центром. Колонии сальмонелл на висмут-сульфит-ГРМ-агара в основном были темно-серого цвета с металлическим блеском.

Эшерихии, ферментирующие углеводы на XLD-агарах, формировали желтые колонии, окруженные желтой зоной преципитации; на Гектоен-агарах и Hektoen Enteric Agar колонии кишечной палочки – оранжевого цвета. На среде XLT-4 агар рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 был подавлен.

На БФЛС-агарах и агарах Эделя–Кампельмахера сальмонеллы вырастали в виде прозрачных слабо-розовых коло-

ний, рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 наблюдался в виде колоний желтого цвета, окруженных зоной преципитации.

На питательных средах висмут-сульфит-ГРМ-агар и Плоскирева ГРМ дифференциация сальмонелл от кишечной палочки была затруднена из-за схожих морфологических признаков.

Питательные среды Brilliance Salmonella Agar и Salmonella Chromogenic agar обеспечивали рост сальмонелл в основном в виде колоний пурпурного цвета, кишечной палочки – сине-зеленого цвета.

Рост тест-штамма *P. mirabilis* ATCC 29852 отсутствовал на питательных средах Salmonella Differential Agar Rajhans Medium и XLT-4 agar. На остальных питательных средах рост протея наблюдался в виде отдельных колоний без роения.

Питательные среды Salmonella Differential Agar Rajhans Medium и Rambach Agar обеспечивали рост колоний сальмонелл ярко-розового и красного цвета соответственно, рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 наблюдался в виде колоний сине-зеленого и синего цвета соответственно.

Для количественной оценки качества питательной среды используют показатель производительности. Поэтому для каждой испытываемой питательной среды был определен коэффициент производительности (PR) (отношение общего количества колоний, полученных на питательной среде, подвергнутой испытанию, к общему количеству колоний, полученных на контрольной питательной среде) [16] (рис. 1).

Из представленных данных видно, что наиболее высокие коэффициенты производительности ($\geq 0,7$) продемонстрировали питательные среды Гектоен-агар, БФЛС, агар Эделя–Кампельмахера, висмут-сульфит-ГРМ-агар, XLD-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) при посеве всех используемых тест-штаммов сальмонелл.

Низкими значениями производительности обладали питательные среды: Salmonella Differential Agar Rajhans Medium, Brilliance Salmonella Agar OXOID, Rambach Agar (Рамбах-агар) и агар Плоскирева ГРМ.

Минимальный коэффициент производительности при посеве тест-штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis var. Kunzendorf 309 обнаружен у хромогенных питательных сред Agar Rajhans Medium и Salmonella Chromogenic agar.

Питательная среда XLT4-агар не обеспечивала рост тест-штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis var. Kunzendorf 309 и имела минимальный коэффициент производительности при посеве тест-штаммов *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin C96 и *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79.

При посеве тест-штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis незначительный коэффициент производительности отмечался у питательных сред: XLT4-агар, XLD agar Conda Pronadisa, Rambach Agar и агар Плоскирева ГРМ.

На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ всех питательных сред: БФЛС-агара, агара Эделя–Кампельмахера, Гектоен-агара, висмут-сульфит-ГРМ-агара, XLD-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ), имеющих высокий показатель производительности на изолятах сальмонелл, выделенных из кормов животного происхождения: *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *S. Give*, *S. Enteritidis*, *S. Oranienburg*, *S. ред-*

Сравнительная оценка питательных сред для выделения сальмонелл из кормов для животных

Таблица. Сравнительная оценка испытываемых питательных сред по биологическим показателям								
№ п/п	Наименование среды	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> var. Kunzendorf 309	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin C96	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 79	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis 11272	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29852	Смесь <i>S. aureus</i> ATCC 25923 + <i>E. faecalis</i> ATCC 19433 разведение 10 ⁻⁴
разведение 10 ⁻⁶ Морфология колоний								
1	БФЛС-агар	круглые, гладкие, светло-розового цвета	круглые, гладкие, светло-розового цвета	круглые, гладкие, светло- розового цвета	круглые, гладкие, светло-розового цвета	желтые, окруженные зоной преципитации желтого цвета	прозрачные	нет роста
2	Агар Эделя– Кампельмахера	круглые, гладкие, светло-розового цвета	круглые, гладкие, светло-розового цвета	круглые, гладкие, светло- розового цвета	круглые, гладкие, светло-розового цвета	желтые, окруженные зоной преципитации желтого цвета	прозрачные колонии	нет роста
3	Висмут-сульфит- ГРМ-агар	темно-серого цвета с мет. блеском и прокрашиванием среды под колониями в черный цвет, мелкие	темно-серого цвета с мет. блеском и прокрашиванием среды под колониями в черный цвет, мелкие	темно-зеленого цвета	темно-серого цвета с мет. блеском и прокрашиванием среды в черный цвет	зеленовато- коричневого цвета	светло- зеленого цвета	нет роста
4	Плоскирева ГРМ	круглые, гладкие, слегка розового цвета	круглые, гладкие, слегка розового цвета	круглые, гладкие, слегка розового цвета	круглые, гладкие, слегка розового цвета	малинового цвета	круглые гладкие колонии, бесцветные	нет роста
5	Brilliance Salmonella Agar Oxoid	круглые, бесцветные, прозрачные	круглые, пурпурного цвета	круглые, ровные, пурпурного цвета	круглые, ровные, пурпурного цвета	сине-зеленого цвета	прозрачные	нет роста
6	Гектоен-агар	сине-зеленого цвета с черным центром	сине-зеленого цвета с черным центром	сине-зеленого цвета с черным центром	сине-зеленого цвета с черным центром	оранжевого цвета	светло- зеленого цвета	нет роста
7	Salmonella Chromogenic agar	круглые, бесцветные, прозрачные	круглые, пурпурного цвета	круглые, ровные, пурпурного цвета	круглые, пурпурного цвета	сине-зеленого цвета	прозрачные	нет роста
8	Salmonella Differential Agar Rajhans Medium	круглые, гладкие, ярко-розового цвета	круглые, гладкие, ярко-розового цвета	круглые, гладкие, ярко- розового цвета	круглые, гладкие, ярко-розового цвета	сине-зеленого цвета	нет роста	нет роста
9	Hektoen Enteric Agar	сине-зеленые с черным центром	сине-зеленые с черным центром	сине-зеленые с черным центром	сине-зеленые с черным центром	оранжевого цвета	светло- зеленого цвета	нет роста
10	Rambach Agar	красного цвета	красного цвета	красного цвета	красного цвета	синего цвета	светло-желтого цвета	нет роста
11	XLD agar (ГНЦ ПМБ)	круглые, прозрачные, бесцветные, с черным центром	круглые, бесцветные, матовые, с черным центром	круглые, прозрачные, бесцветные, с черным центром	круглые, прозрачные, бесцветные, с черным центром	желтые, окруженные желтой зоной преципитации	прозрачные, незначительное почернение	нет роста
12	XLD agar Conda Pronadisa	круглые, прозрачные, бесцветные, с черным центром	круглые, прозрачные, матовые, с черным центром	круглые, прозрачные, с черным центром	круглые, прозрачные, светло-красные с черным центром	желтые, окруженные желтой зоной преципитации	прозрачные	нет роста
13	XLD agar Merck	круглые, прозрачные, бесцветные, блестящие, с черным центром	круглые, прозрачные, бесцветные, блестящие, с черным центром	круглые, прозрачные, бесцветные, блестящие, с черным центром	круглые, прозрачные, светло-красные с черным центром	желтые, окруженные зоной преципитации желтого цвета	прозрачные	нет роста
14	XLT-4 agar (BASE) + XLT agar supplement Merck	нет роста	круглые, прозрачные, бесцветные матовые, с черным центром + зона просветления вокруг	круглые, прозрачные, бесцветные с черным центром	круглые, прозрачные бесцветные, с черным центром	нет роста	нет роста	нет роста

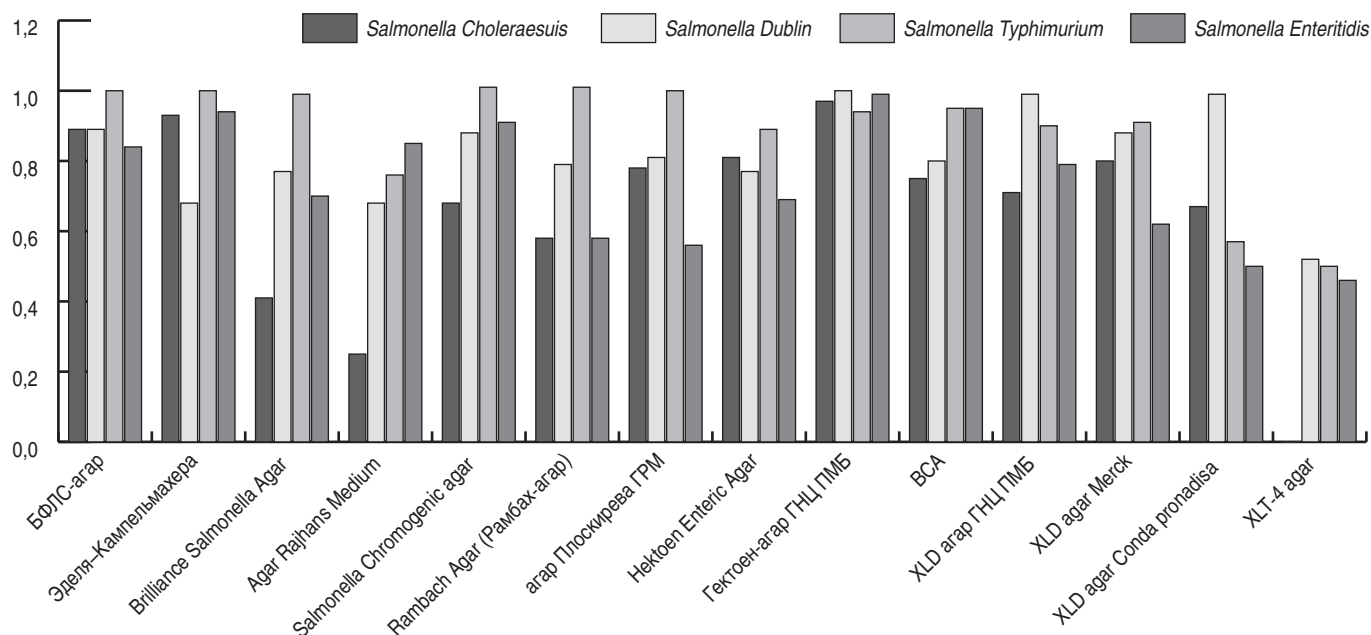


Рис. 1. Коэффициенты производительности питательных сред для выделения сальмонелл.

ких групп изолятов с целью выбора оптимальных питательных сред для усовершенствования исследований в ветлабораториях.

Результаты исследований при посеве изолятов *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *S. Give*, *S. Enteritidis*, *S. Oranienburg*, *S. редких групп* подтвердили высокий коэффициент производительности всех питательных сред: БФЛС-агара, агара Эделя-Кампельмахера, Гектоен-агара, висмут-сульфит-ГРМ-агара, XLD-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ) (рис. 2).

Таким образом, сравнительный анализ большого перечня питательных сред для выделения сальмонелл показал, что четкую дифференциацию сальмонелл и эшерихий обеспечивали следующие питательные среды: XLD-агар производства ГНЦ ПМБ, агар Эделя-Кампельмахера, БФЛС-агар, Гектоен-агар, а также XLT-4, *Salmonella Chromogenic agar* Conda, *Brilliance Salmonella Agar Oxoid*, *Rambach Agar*, *Hektoen Enteric Agar*, *Salmonella Differential Agar Rajhans Medium*.

Висмут-сульфит-ГРМ-агар, агар Плоскирева ГРМ проявили недостаточные дифференцирующие свойства, что в дальнейшем может привести к ложноположительным результатам и необходимости использования дополнительных тестов.

Хромогенные питательные среды обеспечивали четкую дифференциацию энтеробактерий, но продемонстрировали низкую производительность.

По результатам сравнительных исследований всех питательных сред разных производителей оказалось, что питательные среды отечественного производства (XLD-агар, агар Эделя-Кампельмахера, БФЛС-агар, Гектоен-агар) по дифференцирующим свойствам и показателю производительности имели результаты, сравнимые с зарубежными, а по некоторым тест-штаммам сальмонелл превосходили аналоги.

Заключение

Действующие на территории РФ НД по выделению сальмонелл из кормов для животных предусматривают использование минимального набора дифференциально-диагностических питательных сред: висмут-сульфит-агар, среды Плоскирева и Левина.

Представленные в работе экспериментальные данные доказывают возможность использования представленного перечня отечественных питательных сред, имеющих хорошие дифференцирующие свойства и высокую производитель-

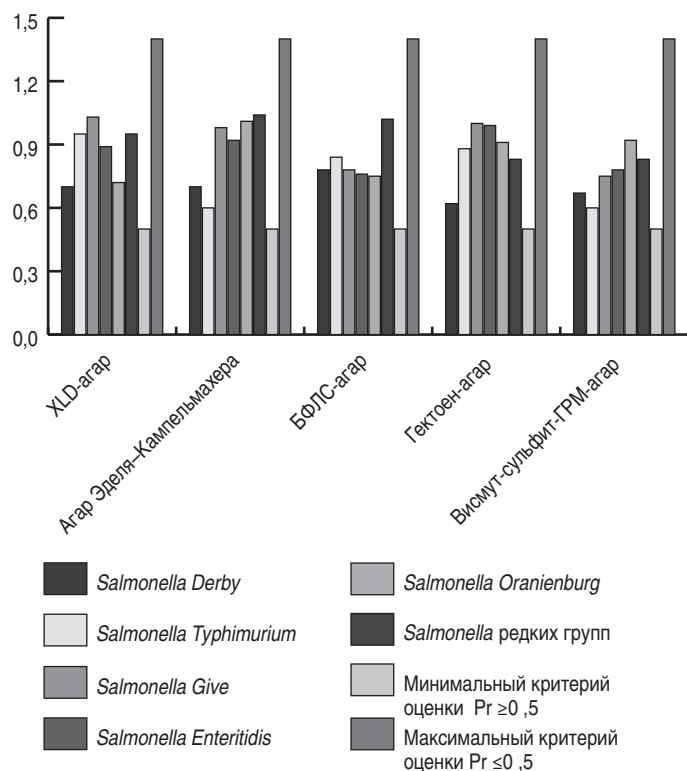


Рис. 2. Коэффициенты производительности питательных сред для выделения бактерий рода *Salmonella* с использованием изолятов, выделенных из кормов.

ность: БФЛС-агара, агара Эделя–Кампельмахера, Гектоен-агара, XLD-агара для выделения сальмонелл из кормов для животных. Внедрение этих питательных сред в методические документы по микробиологическому анализу кормов для животных позволит существенно повысить результативность исследований в бактериологических ветеринарных лабораториях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и ФГБУ ЦНМВЛ.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор and FSBI CSMVL.

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

- Crump JA, Griffin PM, Angulo FJ. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. Clin Infect Dis. 2002 Oct 1;35(7):859-65. DOI: 10.1086/342885
- Li X, Bethune LA, Jia Y, Lovell RA, Proescholdt TA, Benz SA, et al. Surveillance of *Salmonella* prevalence in animal feeds and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. Foodborne Pathog Dis. 2012 Aug;9(8):692-8. DOI: 10.1089/fpd.2011.1083
- Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография. Под ред. Поповой АЮ, Дятлова ИА. 2020, с. 368-77.
- Правила бактериологического исследования кормов, 1975 г.
- ГОСТ 25311-82 Мука кормовая животного происхождения.
- ГОСТ 30134-97 Дрожжи кормовые. Метод ускоренного обнаружения сальмонелл.
- ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажержмачева НИ, Ершова МГ, Полетаева ЕД. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563
- Шепелин АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. М.: Династия; 2017, 231 с.
- Полосенко ОВ, Шепелин АП. Сравнительный анализ питательных сред для определения биохимических свойств энтеробактерий. Бактериология. 2020;5(1):41-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-41-47
- HiMedia Laboratories Pvt Limited. A-406. Bhavershwar Plaza, LBS Marg, Mumbai 400 086, India.
- Диагностические препараты. Каталог продукции. Оболенск: ФБУН ГНЦПМБ, 2022.
- Microbiology Manual. Merck, LPRO UBA-V.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. <https://www.bio-rad.com/>
- Laboratorios CONDA; Calle Forja 9, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid. 15
- ГОСТ 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды.

- Скоморова ЮА, Кремлева АА, Ахметова ЛШ, Подольская ТА, Шепелин АП, Полосенко ОВ. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях. Бактериология. 2020;5(2):24-32. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-24-32

References

- Crump JA, Griffin PM, Angulo FJ. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. Clin Infect Dis. 2002 Oct 1;35(7):859-65. DOI: 10.1086/342885
- Li X, Bethune LA, Jia Y, Lovell RA, Proescholdt TA, Benz SA, et al. Surveillance of *Salmonella* prevalence in animal feeds and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. Foodborne Pathog Dis. 2012 Aug;9(8):692-8. DOI: 10.1089/fpd.2011.1083
- Microbiological quality control of food products. Edited by Popova AYU, Dyatlov IA. 2020, pp. 368-77. (In Russian).
- Regulation of bacteriological examination of feed, 1975. (In Russian).
- GOST 25311-82 Animal feed flour. (In Russian).
- GOST 30134-97 Fodder yeast. The method of accelerated detection of salmonella. (In Russian).
- ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Azhermacheva NI, Ershova MG, Poletaeva ED. Clinical trials of salmonella enrichment medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
- Shepelin AP, Dyatlov IA. Nutrient media for enterobacteria. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2017, 231 p. (In Russian).
- Polosenko OV, Shepelin AP. Comparative analysis of nutrient media for determination of the biochemical properties of enterobacteria. Bacteriology. 2020;5(1):41-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-41-47 (In Russian).
- HiMedia Laboratories Pvt Limited. A-406. Bhavershwar Plaza, LBS Marg, Mumbai 400 086, India.
- Diagnostic preparations. Product catalog. Obolensk: State Research Center for Applied Microbiology And Biotechnology, 2022.
- Microbiology Manual. Merck, LPRO UBA-V.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. <https://www.bio-rad.com/>
- Laboratorios CONDA; Calle Forja 9, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid.
- GOST 11133-2016 Microbiology of food, animal feed and water.
- Skomorina YuA, Kremleva AA, Akhmetova LSh, Podolskaya TV, Shepelin AP, Polosenko OV. Comparative evaluation of nutrient media of *Escherichia coli* isolating for using in veterinary laboratories. Bacteriology. 2020;5(2):24-32. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-24-32 (In Russian).

Информация об авторах:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), Leading researcher of the Microbiological Research Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Определение эффективности алгоритмов библиотеки машинного обучения PyCaret для видовой идентификации микроорганизмов на основании данных времяпролетной масс-спектрометрии

М.Д.Хамитова¹, К.В.Детушев², А.Г.Богун²

¹Автономная некоммерческая организация дополнительного профессионального образования «Школа анализа данных», Москва, Российская Федерация;

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

Работа посвящена оценке возможности применения технологий машинного обучения для анализа данных, полученных при масс-спектрометрии бактериальных культур. В работе использовали масс-листы микроорганизмов видов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, полученные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные данные обрабатывали с применением библиотеки PyCaret и выбранного в ходе исследования алгоритма Light Gradient Boosting Machine. Показано, что при анализе данных, полученных при идентификации штаммов бактерий *E. coli* и *S. aureus* из библиотеки PyCaret, алгоритм Light Gradient Boosting Machine позволяет получать результаты со степенью достоверности около 98%.

Ключевые слова: машинное обучение, масс-спектрометрия, MALDI-TOF, PyCaret

Для цитирования: Хамитова М.Д., Детушев К.В., Богун А.Г. Определение эффективности алгоритмов библиотеки машинного обучения PyCaret для видовой идентификации микроорганизмов на основании данных времяпролетной масс-спектрометрии. Бактериология. 2022; 7(2): 34–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-34-38

Determining the effectiveness of the algorithms of the PyCaret machine learning library for species identification of microorganisms based on time-of-flight mass spectrometry data

M.D.Khamitova¹, K.V.Detushev², A.G.Bogun²

¹Autonomous Non-Commercial Organization of Additional Professional Education "School of Data Analysis", Moscow, Russian Federation;

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

The work is devoted to assessing the possibility of using machine learning technologies for the analysis of data obtained by mass spectrometry of bacterial cultures. We used mass lists of microorganisms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* species obtained using MALDI-TOF mass spectrometry. The obtained data were processed using the PyCaret library and the Light Gradient Boosting Machine algorithm selected during the study. It has been shown that when analyzing data obtained during the identification of bacterial strains of *E. coli* and *S. aureus* from the PyCaret library, the Light Gradient Boosting Machine algorithm makes it possible to obtain results with a confidence level of about 98%.

Key words: machine learning, mass spectrometry, MALDI-TOF, PyCaret

For citation: Khamitova M.D., Detushev K.V., Bogun A.G. Determining the effectiveness of the algorithms of the PyCaret machine learning library for species identification of microorganisms based on time-of-flight mass spectrometry data. Bacteriology. 2022; 7(2): 34–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-34-38

Для корреспонденции:

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: bogun@obolensk.org

Статья поступила 26.06.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Aleksandr G. Bogun, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: bogun@obolensk.org

The article was received 26.06.2022, accepted for publication 30.06.2022

Технологии машинного обучения востребованы во многих областях исследований, связанных с обработкой данных. В данной работе нами была изучена возможность использования технологий машинного обучения для выявления видовой принадлежности штаммов микроорганизмов при идентификации с помощью времяпролетной масс-спектрометрии.

Технологии масс-спектрометрии получили широкое распространение для проведения быстрой видовой идентификации микроорганизмов. Отличительной особенностью этого подхода является универсальность процедуры, связанной с проведением анализа, поскольку для идентификации различных микроорганизмов может быть использован один аппаратно-программный комплекс, состоящий из времяпролетного масс-спектрометра с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и ЭВМ. Другим важным преимуществом является возможность получать близкие данные с использованием разных моделей масс-спектрометров, в т.ч. функционирующих в разных лабораториях.

Ключевой составляющей аппаратно-программного комплекса является база данных, содержащая масс-спектры, характерные для изучаемых микроорганизмов. В настоящее время каждый производитель систем для идентификации бактерий, помимо оборудования собственного производства, создает программное обеспечение, включающее в себя базу данных и алгоритм анализа, которые не предназначены для использования с другим оборудованием.

В настоящее время особый интерес представляет создание объединенной, или универсальной, базы данных и алгоритма анализа, пригодных для обработки информации, получаемой при масс-спектрометрическом анализе на разных моделях оборудования. В связи с тем, что создание и проверка эффективности функционирования подобной базы данных и алгоритмов представляет собой сложную задачу, очень привлекательным является использование технологий машинного обучения. Существенным преимуществом технологий машинного обучения также является возможность выявлять ошибки, допускаемые при работе оператора.

Цель наших исследований заключается в оценке возможности использования технологий машинного обучения с использованием библиотеки PyCaret для идентификации микроорганизмов по результатам их исследования с помощью технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии на примере *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы

Исходные данные. В работе были использованы результаты масс-спектрометрии (масс-листы), выбранные на основании идентификации с использованием комплекса MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics) [1]. В табл. 1 приведен пример масс-листа, полученный в результате масс-спектрометрического исследования штамма *E. coli*. Масс-листы, использованные для машинного обучения в данной работе, могут быть предоставлены авторами работы по запросу.

В работе были использованы по 10 масс-листов для микроорганизмов каждого вида. Для машинного обучения

были выбраны масс-листы, которые при анализе на системе MALDI-Biotyper показывали идентификацию до вида с уровнем индекса достоверности (Score Value) 2,3 и более. Максимальный показатель уровня достоверности идентификации (Score Value), получаемых на системе MALDI-Biotyper, равняется 3. В табл. 2 представлены показатели индекса достоверности для масс-листов, выбранных для работы на основании идентификации на системе MALDI-Biotyper.

Программы и способы машинного обучения. Для обучения модели потребовалось объединить в один массив данных исходные 10 масс-листов. Объединение осуществлялось с помощью программы flexAnalysis (Bruker Daltonics), данные экспортировались в Microsoft Office Excel.

Для машинного обучения была использована виртуальная машина, предоставленная сервером Google Colab (сервис, позволяющий писать код и работать с данными прямо в браузере, без установки программного обеспечения на компьютер).

Для машинного обучения мы используем библиотеку PyCaret, которая содержит 16 вариантов классификаторов, из которых мы сможем выбрать наиболее точно определяющий вид микроорганизмов [2].

PyCaret – библиотека машинного обучения с открытым исходным кодом на Python для обучения и развертывания моделей с учителем и без учителя в low-code среде. Low-code – это концепция создания информационных систем с помощью графических интерфейсов с минимальным (low-code) использованием ручного написания кода или вообще без него [3].

Целью применения концепции low-code является сокращение объема традиционного ручного кодирования и ускорение разработки бизнес-приложений. Кроме этого, важным преимуществом подхода является то, что вклад в проектирование может внести широкий круг людей, обладающих знаниями предметной области и понимающих бизнес-логику, а не только программисты [4].

PyCaret позволит пройти путь от подготовки данных до развертывания модели за несколько секунд. По сравнению с другими открытыми библиотеками машинного обучения PyCaret – это low-code альтернатива, которая поможет заменить сотни строк кода всего парой слов. Скорость проведения более эффективных экспериментов возрастет экспоненциально. PyCaret – это, по сути, оболочка Python над несколькими библиотеками машинного обучения, такими как scikit-learn, XGBoost, Microsoft LightGBM, spaCy и несколькими другими [3].

Результаты и обсуждение

В процессе использования платформы PyCaret нами были оценены 16 алгоритмов машинного обучения. В табл. 3 указана точность предсказаний. Наилучший результат обучения показал алгоритм Light Gradient Boosting Machine.

Light GBM – это быстрая, распределенная, высокопроизводительная структура повышения градиента, основанная на алгоритме дерева решений, используемая для ранжирования, классификации и многих других задач машинного обучения. Поскольку он основан на алгоритмах дерева ре-

Таблица 2. Показатели достоверности идентификации микроорганизмов (MALDI-Biotyper)

№	Вид микроорганизма	Score Value	Дата эксперимента
1	<i>E. coli</i>	2,487	17.03.2022
2	<i>E. coli</i>	2,464	17.03.2022
3	<i>E. coli</i>	2,419	17.03.2022
4	<i>E. coli</i>	2,522	17.03.2022
5	<i>E. coli</i>	2,514	17.03.2022
6	<i>E. coli</i>	2,482	17.03.2022
7	<i>E. coli</i>	2,416	17.03.2022
8	<i>E. coli</i>	2,346	17.03.2022
9	<i>E. coli</i>	2,372	17.03.2022
10	<i>E. coli</i>	2,399	17.03.2022
11	<i>S. aureus</i>	2,276	19.03.2021
12	<i>S. aureus</i>	2,389	25.03.2021
13	<i>S. aureus</i>	2,399	25.03.2021
14	<i>S. aureus</i>	2,341	25.03.2021
15	<i>S. aureus</i>	2,355	18.10.2021
16	<i>S. aureus</i>	2,359	18.10.2021
17	<i>S. aureus</i>	2,360	10.12.2021
18	<i>S. aureus</i>	2,361	10.12.2021
19	<i>S. aureus</i>	2,352	31.01.2022
20	<i>S. aureus</i>	2,341	31.01.2022

шений, он разделяет лист дерева с наилучшим соответствием, тогда как другие алгоритмы повышения делят дерево по глубине или уровню, а не по листу. Таким образом, при выращивании на одном и том же листе в Light GBM листовой алгоритм может снизить потери по сравнению с поуровневым и, следовательно, приводит к гораздо лучшей точности, что редко может быть достигнуто любым из существующих алгоритмов повышения [5].

Отдельные деревья решений можно легко интерпретировать, просто визуализируя их структуру. Поскольку в модели градиентного бустинга содержатся сотни деревьев, ее нелегко интерпретировать путем визуализации входящих в нее деревьев. При этом хотелось бы, как минимум, понимать, какие именно признаки данных оказывают наибольшее влияние на предсказание композиции (рис. 1).

Можно сделать следующее наблюдение: признаки, используемые в верхней части дерева, влияют на окончательное предсказание для большей доли обучающих объектов, чем признаки, попавшие на более глубокие уровни. Таким образом, ожидаемая доля обучающих объектов, для которых происходило ветвление по данному признаку, может быть использована в качестве оценки его относительной важности для итогового предсказания. Усредняя полученные оценки важности признаков по всем решающим деревьям из ансамбля, можно уменьшить дисперсию такой оценки и использовать ее для отбора признаков.

Для определения важности параметров и исключения из данных параметров, которые не влияют на точность предсказания, нами был использован инструмент `feature_importance` (важность признаков). Метод оценки важности

Таблица 3. Результаты использования различных алгоритмов машинного обучения

Модель	Точность
lightgbm	Light Gradient Boosting Machine
catboost	CatBoost Classifier
rf	Random Forest Classifier
xgboost	Extreme Gradient Boosting
dt	Decision Tree Classifier
et	Extra Trees Classifier
gbc	Gradient Boosting Classifier
ada	Ada Boost Classifier
ida	Linear Discriminant Analysis
ridge	Ridge Classifier
knn	K Neighbors Classifier
qda	Quadratic Discriminant Analysis
lr	Logistic Regression
nb	Naïve Bayes
dummy	Dummy Classifier
svm	SVM-Linear Kernel

`feature_importance` встроен в алгоритмы построения ансамблей деревьев и основан на вычислении суммарного уменьшения минимизируемого функционала ошибки с помощью ветвлений по рассматриваемому признаку. Сравниваемые пары листьев имеют разные значения разделения в узле на пути к этим листьям. Если условие разделения выполнено, объект переходит в левое поддерево, в противном случае он переходит в правое [6]. Согласно результатам оценки параметров (рис. 2) было принято решения исключить из данных параметры: площадь (Area) и полуширина сигнала (FWHM), время (time), разрешение (Res.), так как они имеют наименьшую важность.

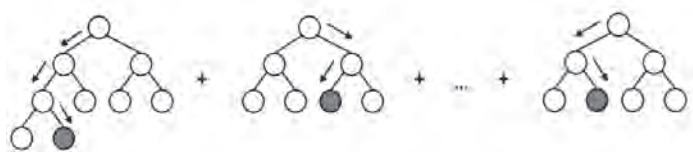


Рис. 1. Разделение листьев в дереве решений в алгоритме Light GBM.

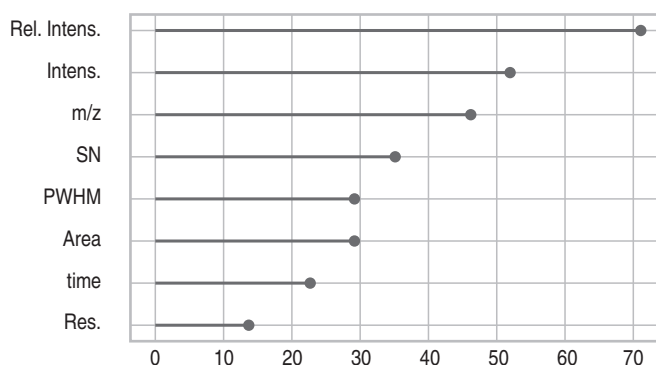


Рис. 2. Оценка параметров, влияющих на точность определения вида.

99,54%	0,46%	<i>E. coli</i>
1,47%	98,53%	<i>S. aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	

Рис. 3. Матрица точности идентификации бактерий на тестовых данных.

В процессе машинного обучения признаки, имеющие высокую важность, создают «шумы», ухудшающие итоговые результаты предсказания.

Матрица показывает, что после обучения на тестовых данных алгоритм определил вид *E. coli* с точностью 99,54%, *S. aureus* – с точностью 98,53% (рис. 3).

Выводы

В проведенной нами работе показано, что технологии машинного обучения с использованием библиотеки PyCaret могут различать данные, полученные при рутинной идентификации патогенных микроорганизмов, методом масс-спектрометрии. Установлено, что при анализе данных, полученных при идентификации штаммов бактерий *E. coli* и *S. aureus*, алгоритм Light Gradient Boosting Machine позволяет получать наиболее достоверные результаты.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что использование технологий машинного обучения при идентификации микроорганизмов является перспективным направлением исследований.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, van Hal SJ. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. J Clin Microbiol. 2011 Aug;49(8):2980-4. DOI: 10.1128/JCM.00431-11
2. Train – PyCaret Official [Электронный ресурс]. URL: <https://pycaret.gitbook.io/docs/get-started/functions/train> (дата обращения 20.06.2022).
3. Представляем PyCaret: открытую low-code библиотеку машинного обучения на Python. Хабр. URL: <https://habr.com/ru/company/otus/blog/497770/> (дата обращения 20.06.2022).
4. Малокодовая разработка (Low-code) Loginom Wiki [Электронный ресурс]. URL: <https://wiki.loginom.ru/articles/low-code.html> (дата обращения 20.06.2022).
5. Machine Learning Mystery. URL: <https://www.machinelearningmastery.ru/lightgbm-vs-xgboost-which-algorithm-win-the-race-1ff7dd4917d/>
6. Feature importances with a forest of trees – scikit-learn 1.1.1 documentation [Электронный ресурс]. URL: https://scikit-learn.org/stable/auto_examples/ensemble/plot_forest_importances.html (дата обращения 20.06.2022).

References

1. Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, van Hal SJ. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. J Clin Microbiol. 2011 Aug;49(8):2980-4. DOI: 10.1128/JCM.00431-11
2. Train – PyCaret Official. URL: <https://pycaret.gitbook.io/docs/get-started/functions/train> (accessed 20.06.2022).
3. PyCaret: an open low-code machine learning library in Python. Habr. URL: <https://habr.com/ru/company/otus/blog/497770/> (accessed 20.06.2022). (In Russian).
4. Low-income development (Low-code) Loginom Wiki. URL: <https://wiki.loginom.ru/articles/low-code.html> (accessed 20.06.2022). (In Russian).
5. Machine Learning Mystery. URL: <https://www.machinelearningmastery.ru/lightgbm-vs-xgboost-which-algorithm-win-the-race-1ff7dd4917d/>
6. Feature importances with a forest of trees – scikit-learn 1.1.1 documentation [Электронный ресурс]. URL: https://scikit-learn.org/stable/auto_examples/ensemble/plot_forest_importances.html (accessed 20.06.2022).

Информация о соавторах:

Хамитова Мария Дмитриевна, студентка Автономной некоммерческой организации дополнительного профессионального образования «Школа анализа данных»

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Maria D. Khamitova, student, Autonomous Non-Commercial Organization of Additional Professional Education "School of Data Analysis"

Konstantin V. Detushev, Junior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Распространение и биологические свойства стафилококков, выделенных от медицинского персонала хирургических клиник

Н.И.Мамарасулова

Самаркандский медицинский университет, Самарканд, Республика Узбекистан

Носительство патогенных стафилококков среди медицинских работников хирургических клиник и родильных домов является, по мнению большого числа исследователей, основным источником *Staphylococcus aureus*, вызывающих нередко послеоперационные осложнения. При этом следует иметь в виду эпидемиологическую неоднозначность носителей разных категорий. Всего было изучено 747 культур стафилококков, выделенных от 208 человек. Все обследованные были распределены по категориям носительства: в 1-ю группу носителей были отнесены 49 человек, во 2-ю группу – 31 человек (у них высевались *S. aureus*, различавшиеся по фаготипам); в 3-ю группу – 50 человек. У 73 человек стафилококки не были выделены ни разу.

Ключевые слова: носительство, *Staphylococcus aureus*, коагулазопозитивные штаммы, чувствительность, антибиотики

Для цитирования: Мамарасулова Н.И. Распространение и биологические свойства стафилококков, выделенных от медицинского персонала хирургических клиник. Бактериология. 2022; 7(2): 39–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-39-41

Distribution and biological properties staphylococci isolated from medical staff of surgical clinics

N.I.Mamarasulova

Samarkand Medical University, Samarkand, Uzbekistan

Pathogenic staphylococci among medical workers of surgical clinics and maternity hospitals are, according to a large number of researchers, the main source of *Staphylococcus aureus*, which often cause postoperative complications. At the same time, it should be borne in mind the epidemiological ambiguity of carriers of different categories. A total of 747 cultures of staphylococci isolated from 208 people were studied. All the surveyed were divided into carrier categories: 49 people were assigned to the 1st carrier group, 31 people were assigned to the 2nd carrier group, *S. aureus* was sown in them, differing in phagotypes; the 3rd carrier group consisted of 50 people. In 73 people, staphylococci were not isolated once.

Key words: carrier, *Staphylococcus aureus*, coagulase-positive strains, sensitivity, antibiotics

For citation: Mamarasulova N.I. Distribution and biological properties staphylococci isolated from medical staff of surgical clinics. Bacteriology. 2022; 7(2): 39–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-39-41

Здоровое носительство *Staphylococcus aureus* является одним из важнейших факторов в эпидемиологии инфекций, вызываемых этими микробами [1]. Носители патогенных стафилококков среди медицинских работников хирургических клиник и родильных домов являются, по мнению большого числа исследователей, основным источником *S. aureus*, вызывающих нередко послеоперационные осложнения [2–4]. При этом следует иметь в виду эпидемиологическую неоднозначность носителей разных категорий [5]. Роль основных первичных источников инфекции принадлежит постоянным, или резидентным, носителям «госпитальных штаммов» из числа персонала клиник [4, 6].

Целью исследования является определение частоты распространения носительства *S. aureus* среди медицинского персонала.

Материалы и методы

Нами было проведено 3-кратное обследование 208 человек, работающих в клинике Сельского района Самарканда.

Забор материала производился стерильным ватным тампоном со слизистой нижних носовых ходов, посевы делались на желточно-солевом агаре (ЖСА). После 48-часовой инкубации при температуре 37°C отмечали массивность

Для корреспонденции:

Мамарасулова Нафиса Исрофиловна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Самаркандского медицинского университета

Адрес: 140100, Самарканд, ул. Амира Темура, 18

Телефон: (998 66) 233-0841

E-mail: mamarasulovan@mail.ru

Статья поступила 11.05.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Nafisa I. Mamarasulova, Assistant of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Samarkand Medical University

Address: 18, Amir Temur str., Samarkand, 140100, Republic of Uzbekistan

Phone: (998 66) 233-0841

E-mail: mamarasulovan@mail.ru

The article was received 11.05.2022, accepted for publication 30.06.2022

роста стафилококков, а отдельные колонии (2–3) осевали для последующего изучения биологических свойств.

У всех выделенных штаммов определялась плазмокоагулазная активность, затем коагулазопозитивные штаммы изучались по следующим биологическим свойствам: продукция лецитовителлазы, ДНКазы, гемолизина, лизоцимоподобного фермента, фаголизательность культур стафилофагами Международного набора поливалентных фагов, а также чувствительность к 7 антибиотикам методом стандартных дисков.

При определении ряда биологических свойств выделенной коллекции штаммов мы пользовались штампом-«ежиком»; при определении антибиограммы применялся метод ускоренного посева культур.

Результаты и обсуждение

Всего было изучено 747 культур стафилококков, выделенных от 208 человек. Все обследованные были распределены по категориям носительства. В 1-ю группу «злостных» носителей были отнесены 49 (23,6%) человек. У этих лиц при 3-кратном обследовании с интервалом в 1,5–2 мес. высевались *S. aureus* одного и того же фаготипа. Во 2-ю группу – «постоянных» носителей – 31 (13,5%) человек, у них высевались *S. aureus*, различавшиеся по фаготипам. 3-ю группу «временных» носителей составили 50 (24,0%) человек. У 73 (37,5%) человек стафилококки не были выделены ни разу.

При распределении обследованных лиц по категориям носительства в зависимости от профессии оказалось, что носителей среди врачей было 43 (33,0%), среднего медицинского персонала – 64 (49,0%) и младшего медицинского персонала – 23 (18,0%). Группу «злостных» носителей составили 48,8% врачей, 35,9% среднего медицинского персонала и 21,8% младшего медицинского персонала; «постоянных» – 23,2% врачей, 22,9% среднего медицинского персонала и 30,4% младшего медицинского персонала.

Таким образом, наибольший удельный вес «злостных» носителей приходится на врачей, «постоянных» – на младший медицинский персонал. От 130 носителей было выделено и изучено 320 штаммов *S. aureus*, причем от «злостных» – 155 штаммов, от «постоянных» – 88 и от «временных» – 77. Штаммы, изолированные от «злостных» носителей, чаще обладали биологической активностью. Отмечена корреляционная связь ДНКазной активности, выработки α -гемолизина, а также лецитовителлазной и плазмокоагулазной активности. 90,9% культур, полученных от носителей этой категории, типировались использованными стафилофагами.

Штаммы, выделенные от «постоянных» и «временных» носителей, по биологическим свойствам оказались менее активными. Исключение составляет продукция δ -гемолизина (80,6% – у «постоянных» и 79,2% – у «временных»). Среди штаммов стафилококков, изолированных от «временных» носителей, оказалось несколько больше активных по продукции лецитовителлазы, α -гемолизина, чем среди культур, выделенных от «постоянных» носителей. Если учесть, что

штаммы высевались преимущественно при втором и третьем обследовании, то можно предположить вероятное инфицирование штаммами с такими биологическими свойствами, распространенными среди персонала клиники.

У носителей всех категорий обсемененность слизистой носа стафилококками была значительной.

Так, массивный рост *S. aureus* выделялся на чашках ЖСА первичного посева от 63,2% «злостных» носителей, 57,9% «постоянных» и 59,7% «временных». Среди 320 штаммов *S. aureus*, выделенных от носителей – персонала клиник и изученных на чувствительность к антибиотикам, большинство оказалось устойчивыми к пенициллину (253, 80%), меньшее число – к другим препаратам: амоксициллину (69, 21,6%), цефазалину (75, 23,4%), ципрофлоксацину (83, 25,9%), цефтиазедиму (33, 10,3%), и лишь единичные – к цефепиму (3,2%) и цефатаксиму (0,9%). При этом культуры, устойчивые одновременно к трем и более антибиотикам, составили 23,4% от всех выделенных.

По фагогруппам штаммы, выделенные от носителей разных категорий, распределялись следующим образом. Наибольшее число штаммов, изолированных со слизистой носа носителей различных категорий, типировалось поливалентным фагом (61,3% – от «злостных», 42,0% – от «постоянных» и 39,0% – от «временных»); к I фагогруппе принадлежали 12,9% штаммов, выделенных от «злостных», 16,0% – от «постоянных» и 7,8% – от «временных»; ко II фагогруппе – 5,8% от «злостных», 8,0% от «постоянных» и 14,3% от «временных»; к III фагогруппе – 7,7% от «злостных», 3,4% от «постоянных» и 13,0% от «временных».

Выводы

Таким образом, наибольший удельный вес «злостных» носителей приходится на врачей, «постоянных» – на младший медицинский персонал. От 130 носителей было выделено и изучено 320 штаммов *S. aureus*, причем от «злостных» – 155 штаммов, от «постоянных» – 88 и от «временных» – 77. Штаммы, изолированные от «злостных» носителей, чаще обладали биологической активностью. Отмечена корреляционная связь ДНКазной активности, выработки α -гемолизина, а также лецитовителлазной и плазмокоагулазной активности. 90,9% культур, полученных от носителей этой категории, типировались использованными стафилофагами.

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. Инфекционные болезни у детей. Под ред. Тимченко ВН. 2-е изд. СПб.: Специальная литература; 2006, с. 325-341.
2. Детские инфекционные болезни. Лечебная практика. Под ред. Цыркунова ВМ, Васильева ВС, Астапова АА. Минск: АСАР; 2013, 512 с.
3. Бехтерева МК, и др. Принципы антимикробной терапии острых кишечных инфекций у детей. Педиатрия. 2015;2:51-6.
4. Одилова ГМ, Юсупов МИ. Течение стафилококковых энтероколитов у детей раннего возраста. Проблемы биологии и медицины. 2021;5(130):158-9.
5. Одилова ГМ, Шайкулов ХШ, Юсупов МИ. Клиникобактериологическая характеристика стафилококковых диарей у детей грудного возраста. Доктор ахборотномаси. 2020;4(97):70-3.
6. Белятич ЛИ, Зинченко ЛИ, Ключева ЕВ. Метициллинрезистентные стафилококки среди возбудителей инфекции кожи и мягких тканей в гнойном хирургическом стационаре. Бактериология. 2021;6(3):26.

References

1. Infectious diseases in children. Edited by Timchenko VN. 2nd ed. St. Petersburg: "Special Literature" Publ.; 2006, pp. 325-341. (In Russian).
2. Children's infectious diseases. Edited by Tsyrcunov VM, Vasilyev VS, Astapov AA. Minsk: "ASAR" Publ.; 2013, 512 p. (In Russian).
3. Bekhtereva MK, et al. Principles of antimicrobial therapy of acute intestinal infections in children. Pediatrics 2015;2:51-6. (In Russian).
4. Odilova GM, Yusupov MI. The course of staphylococcal enterocolitis in young children. Problems of Biology and Medicine. 2021;5(130):158-9. (In Russian).
5. Odilova GM, Shaikulov KhSh, Yusupov MI. Clinical and bacteriological characteristics of staphylococcal diarrhea in infants. Doctor ahhobotnomasi. 2020;4(97):70-3. (In Russian).
6. Belyatich LI, Zinchenko LI, Klyueva EV. Methicillin-resistant staphylococci among pathogens of skin and soft tissue infections in a purulent surgical hospital. Bacteriology. 2021;6(3):26. (In Russian).

НОВОСТИ НАУКИ

Бактериальные метатранскриптомы в сточных водах могут дифференцировать инфицированные вирусом человеческие популяции

В недавнем исследовательском отчете из США ученые показали, что бактериальные таксономические и функциональные профили могут различать статус коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) даже без прямого обнаружения вирусных ранскриптов. Открыта дверь для совершенно новых подходов в эпидемиологии сточных вод.

Эпидемиология сточных вод для отслеживания заболеваний представляет собой концепцию, которая в последние годы становится все более распространенной благодаря многим преимуществам по сравнению с традиционными подходами, поскольку она может предоставить особенно полную информацию о различных сообществах.

Этот метод неинвазивен и экономически эффективен по сравнению с индивидуальными клиническими испытаниями. Кроме того, не требуется личного согласия на клиническое тестирование, чтобы сообщить о результатах в органы общественного здравоохранения.

В настоящее время схема эпидемиологии на основе сточных вод ограничена обнаружением и характеристикой патогенов с использованием ПЦР в реальном времени и методов секвенирования, что означает, что она не может обнаруживать возбудителей болезней, для которых не разработан скрининг-тест.

Недавние исследования, в которых использовалась система мониторинга сточных вод с высоким пространственным разрешением и высокой пропускной способностью в кампусе колледжа, показали, что можно собрать и охарактеризовать тысячи образцов сточных вод с помощью ПЦР в реальном времени, выявляющие 85% клинических случаев, вызванных SARS-CoV-2, а также позволяют проводить геномный надзор за новыми вариантами, вызывающими озабоченность, путем полного секвенирования генома.

Результаты исследования показали, что метатранскриптомы сточных вод могут выявлять следы редких патогенов посредством изменений микробиома инфицированных людей, которые впоследствии отражаются в микробиоме сточных вод.



Salido RA, Martino C, Karthikeyan S, et al.

Bacterial metatranscriptomes in wastewater can differentiate virally infected human populations.
bioRxiv 2022.02.23.481658. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.02.23.481658>

Изменения комплементарной активности сыворотки крови у детей, больных острой дизентерией в сочетании с глистной инвазией

Г.М.Одилова, М.И.Юсупов

Самаркандский медицинский университет, Самарканд, Республика Узбекистан

При неспецифической реактивности детского организма при патологических состояниях значительное место занимает изучение комплементарной активности сыворотки крови. В ходе изучения клинико-иммунологических особенностей острой дизентерии у детей обратили особое внимание на иммунологические изменения в организме больных «чистой» дизентерией.

В работе исследовали 158 детей, больных острой дизентерией. У всех проводилось бактериологическое исследование. Острая дизентерия в сочетании с гельминтозами и лямблиозом протекала с более выраженными симптомами интоксикации, проявлениями колита и более обширными и глубокими поражениями в дистальном отделе толстого кишечника.

Ключевые слова: дизентерия, лямблиоз, шигеллы, кровь, *Shigella sonnei*

Для цитирования: Одилова Г.М., Юсупов М.И. Изменения комплементарной активности сыворотки крови у детей, больных острой дизентерией в сочетании с глистной инвазией. Бактериология. 2022; 7(2): 42–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-42-44

Changes in the complementary activity of the blood serum in children with acute dysentery in combination with helminthic invasion

G.M.Odilova, M.I.Yusupov

Samarkand Medical University, Samarkand, Uzbekistan

The study of the complementary activity of blood serum occupies a significant place in the nonspecific reactivity of the child's organism in pathological conditions. The study of clinical and immunological features of acute dysentery in children paid special attention to immunological changes in the body of patients with «pure» dysentery.

We examined 158 children with acute dysentery. All of them underwent bacteriological examination. Acute dysentery in combination with helminthiasis and giardiasis proceeded with more pronounced symptoms of intoxication, manifestations of colitis and more extensive and deep lesions in the distal large intestine

Key words: Dysentery, lamblia, shigella, blood, *Shigella sonnei*

For citation: Odilova G.M., Yusupov M.I. Changes in the complementary activity of the blood serum in children with acute dysentery in combination with helminthic invasion. Bacteriology. 2022; 7(2): 42–44. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-42-44

В суждении о неспецифической реактивности детского организма [1] при патологических состояниях значительное место занимает изучение комплементарной активности сыворотки крови [2]. Авторы, изучавшие клинико-иммунологические особенности острой дизентерии у детей, обратили особое внимание на иммунологические изменения в организме больных «чистой» дизентерией [3, 4]. И лишь в единичных работах приводятся результаты изучения иммунологических сдвигов в организме больных острой дизентерией в сочетании с глистной инвазией и лямблиозом [5, 6]. В

литературе имеются данные, которые свидетельствуют не только о своеобразии клиники сочетанного течения острой дизентерии с глистной инвазией и лямблиозом, но и о значительном угнетении иммунологической реактивности организма в течение заболевания [4, 7]. Однако иммунологический статус организма больных детей при подобных микстинфекциях изучен недостаточно [8].

Цель исследования – изучить комплементарную активность сыворотки крови при дизентерии и установить зависимость ее показателей от сопутствующих заболеваний.

Для корреспонденции:

Одилова Гулноза Махсудовна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Самаркандского медицинского университета

Адрес: 140100, Самарканд, ул. Амира Темура, 18

Телефон: (998 66) 233-0841

E-mail: Gulnoza_5999@mail.ru

Статья поступила 11.05.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Gulnoza M. Odilova, Assistant of the Department Microbiology, Virology and Immunology, Samarkand Medical University

Address: 18 Amir Temur str., Samarkand, 140100, Republic of Uzbekistan

Phone: (998 66) 233-0841

E-mail: Gulnoza_5999@mail.ru

The article was received 11.05.2022, accepted for publication 30.06.2022

Пациенты и методы

Под нашим наблюдением находились 158 детей, больных острой дизентерией, у всех проводилось бактериологическое исследование. У 68 больных обнаружены шигеллы *Shigella sonnei*, у 61 – *S. flexneri*. Изучение клиники показало, что заболевание протекало в среднетяжелой и тяжелой форме у большинства (77,5%) детей, больных острой дизентерией с сопутствующей глистной инвазией, и у 51,6% больных с сопутствующим лямблиозом, тогда как при «чистой» дизентерии подобные клинические формы отмечены лишь у 34,0% больных. Острая дизентерия в сочетании с гельминтозами и лямблиозом протекала с более выраженными симптомами интоксикации, проявлениями колита и более обширными и глубокими поражениями в дистальном отделе толстого кишечника.

При изучении комплементарной активности сыворотки крови у всех больных (158) мы разделили их на 3 группы: в 1-ю ($n = 58$) вошли больные острой дизентерией в сочетании с глистной инвазией, во 2-ю ($n = 50$) – в сочетании с лямблиозом, в 3-ю (контрольную) ($n = 50$) – без сопутствующих инвазий. Комплементарную активность изучали при разных формах тяжести и в динамике заболевания. Полученные результаты у больных 3 групп подвергли сравнительному анализу.

Результаты и обсуждение

Наши наблюдения показали, что изменения комплементарной активности сыворотки крови в определенной степени зависят от периода болезни и сопутствующих инвазий. Так, в первую неделю заболевания у подавляющего большинства больных 1-й группы (47 из 58) титр комплемента оказался пониженным, причем у половины из них (28 из 58) – значительно. Во 2-й группе титр комплемента был сниженным также у большинства (35 из 50), однако это снижение носило менее выраженный характер. В контрольной группе преобладали случаи (28 из 50), когда титр комплемента оставался в пределах нормы, у остальных детей он был сниженным, однако значительное снижение его отмечалось в 1,5–2 раза реже, чем у больных двух первых групп. Особенно низкой комплементарная активность сыворотки крови была у больных острой дизентерией с сопутствующим аскаридозом и гименолепидозом. Так, у 2/3 таких больных на первой неделе болезни титр комплемента находился в пределах 0,09—ОД.

По мере улучшения общего состояния, уменьшения интоксикации, а у больных с сопутствующими инвазиями – после проведения противопаразитарной терапии, во всех трех группах комплементарная активность сыворотки крови постепенно повышалась. С 10-го дня болезни число больных с нормализовавшимся титром комплемента составило в 1-й группе 23,2%, во 2-й – 48,0%, в 3-й – 64,0%. Перед выпиской (20–29-й день) комплементарная активность сыворотки крови оставалась пониженной примерно у 2/3 больных 1-й группы и почти у половины – 2-й группы, в то время как у больных «чистой» дизентерией низкие показатели комплементарной активности отмечены менее чем в 1/3 случаев.

Таким образом, по мере выздоровления постепенно восстанавливалась комплементарная активность во всех группах, однако у больных 1-й группы со значительным (почти в 2 раза) отставанием. У части из них титр комплемента оставался низким длительное время (>2 мес.).

Нам удалось выявить прямую зависимость комплементарной активности сыворотки крови от тяжести болезни. В начальном периоде при стертых и легких формах болезни более чем в половине случаев титр комплемента оставался в пределах нормы, у остальных больных был умеренно снижен. При среднетяжелой и тяжелой формах титр комплемента был понижен почти у всех больных (76 из 78), причем у большинства значительно (32 и 17 соответственно формам). В разгар болезни со стертым и легким течением комплементарная активность была преимущественно умеренно снижена лишь у 1/3 больных, тогда как при среднетяжелой форме – в подавляющем большинстве (69 из 78), причем нередко (31 ребенок) значительно.

Период реконвалесценции характеризовался нормализацией показателей титра комплемента у большинства больных со стертыми и легкими формами болезни, оставаясь сниженным соответственно у 5 и 8 детей. У подавляющего большинства больных со среднетяжелой и тяжелой формами они оставались низкими, и средние титры были достоверно понижены ($p < 0,001$).

Выводы

Таким образом, комплементарная активность сыворотки крови больных детей зависит от периода, клинической картины болезни, а также от сопутствующих инвазий. Особенно выражено снижение титра комплемента при тяжелых формах дизентерии и сопутствующем аскаридозе к гименолепидозе. Угнетение иммунных механизмов, характеризующих состояние реактивности организма ребенка, при сопутствующей глистной инвазии и лямблиозе поможет практическим врачам построить комплексную патогенетическую терапию.

Информация о финансировании

Бюджетное финансирование.

Financial support

Budget financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Мазанкова ЛН. Детские инфекции. Справочник практического врача. М.: МЕДпресс-информ, 2016, 304 с.
2. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. Water Res. 2011 Dec 15;45(20):6603–14. DOI: 10.1016/j.watres.2011.10.013
3. Змушко ЕИ, Белозеров ЕС., Митин ЮА. Клиническая иммунология. СПб.: Питер; 2001.

4. Детские инфекционные болезни. Лечебная практика. Под общ. ред. Цыркунова ВМ, Васильева ВС, Астапова АА. Минск: АСАР; 2013, 512 с.
5. Халафли ХН. Влияние кишечных паразитозов на состояние здоровья детей. Фундаментальные исследования. 2013;9-1:156-162.
6. Файзуллина РГ. Современные аспекты диагностики и лечения лямблиоза. Вопросы современной педиатрии. 2015;1 (1):108-13.
7. Инфекционные болезни у детей. Под ред. Тимченко ВН. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: Специальная литература; 2006, с. 325-41.
8. Юсупов МИ, Матякубова ФЭ. Лабораторная диагностика дизентерии у детей. Педиатр. 2017;8(8):366.

References

1. Mazankova LN. Children's infections. Moscow: "MEDpress-inform" Publ.; 2016, - 304 p. (In Russian).
2. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. Water Res. 2011 Dec 15;45(20):6603-14. DOI: 10.1016/j.watres.2011.10.013

3. Zmushko EI, Belozherov ES, Mitin YuA. Clinical immunology. St. Petersburg: "Piter" Publ.; 2001. (In Russian).
4. Children's infectious diseases. Editet by Tsytkunov VM, Vasilyev VS, Astapov AA. Minsk: "ASAR" Publ.; 2013, 512 p. (In Russian).
5. Khalafli HN. Influence of intestinal parasitosis on the health status of children. Fundamental Research. 2013;9-1:156-162. (In Russian).
6. Fayzullina RG. Modern aspects of the diagnosis and treatment of giardiasis. Current Pediatrics. 2015;1(1):108-13. (In Russian).
7. Infectious diseases in children. Edited by Timchenko VN. 2nd ed. St. Petersburg: "Special Literature" Publ.; 2006, pp. 325-341. (In Russian).
8. Yusupov MI, Matyakubova FE. Laboratory diagnosis of dysentery in children. Pediatrician. 2017;8(8):366. (In Russian).

Информация об авторе:

Юсупов Машраб Исмтиллоевич, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Самаркандского медицинского университета

Information about author:

Mashrab I. Yusupov, Assistant of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Samarkand Medical University

НОВОСТИ НАУКИ

Безопасно изучать опасные инфекции стало намного проще

Исследователи из Национальной лаборатории Лоуренса Беркли (Berkeley Lab) и Гейдельбергского университета в Германии увеличили скорость визуализации инфицированных клеток с помощью мягкой рентгеновской томографии, метода микроскопической визуализации, который может генерировать невероятно подробные трехмерные сканы.

Эта новая методика занимает всего несколько минут для сбора данных, для которых потребовались бы недели подготовки и анализа с помощью других методов, что дает ученым простой способ быстро изучить, как внутренний механизм наших клеток реагирует на SARS-CoV-2 или другие патогены, а также как клетки реагируют на лекарства, предназначенные для лечения инфекции.

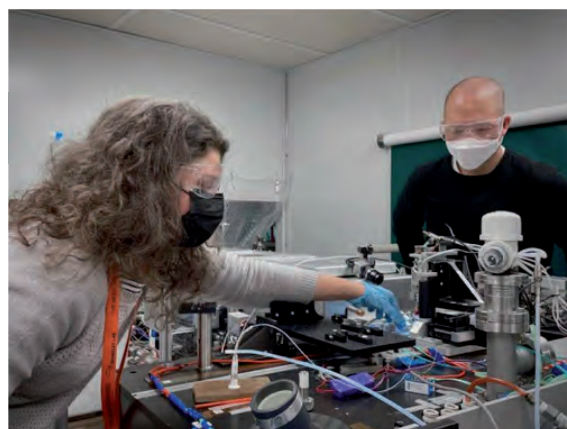
Ученые разработали мягкую рентгеновскую томографию (SXT) в начале 2000-х годов, чтобы заполнить пробелы, оставленные другими методами клеточной визуализации. В рамках исследования, опубликованного в Cell Reports Methods в конце прошлого года, был выполнен SXT-анализ на образцах клеток легких человека.

Ученые заразили клетки вирусом SARS-CoV-2, химически зафиксировали их с помощью соединений на основе альдегидов – процесс, который убивает клетки и сохраняет их, иммобилизованными, в их последнем живом состоянии, а также инактивирует любые оставшиеся вирусные частицы) – через 6 и 24 часа после заражения.

Полученные 3D-изображения имели высокий уровень детализации и четкости, которым известен SXT, несмотря на химическую фиксацию клеток. Они показали развитие своеобразного компартмента почти во всех изученных инфицированных клетках, которым клетка пытается переработать или удалить все вирусные репродуктивные механизмы.

Этот подход позволит многим лабораториям безопасно получать изображения инфицированных клеток без известных рисков и соответствующих необходимых протоколов безопасности при работе с живыми инфицированными клетками.

Авторы считают, что их результаты помогут мировому научному сообществу изучить COVID-19 и, возможно, другие заболевания.



Safely studying dangerous infections just got a lot easier [Электронный ресурс].

URL: <https://phys.org/news/2022-02-safely-dangerous-infections-lot-easier.html> (дата обращения: 28.02.2022).

Сравнительная характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных от больных с различными поражениями кожи и от здоровых людей

М.И.Юсупов

Самаркандский медицинский университет, Самарканд, Республика Узбекистан

Последнее время все чаще появляются сообщения об этиологической роли так называемых «непатогенных» стафилококков, в основном *Staphylococcus epidermidis*, в ряде заболеваний: мочевыводящих путей, конъюнктивитов у новорожденных детей, раневой и гнойной инфекций, острых гастроэнтеритов, эндокардитов. Было проведено комплексное микробиологическое обследование 146 пациентов. Из них 88 – больные с кожными заболеваниями и 49 – здоровые лица. Всего было изучено 428 штаммов, изучена биологическая характеристика коагулазонегативных стафилококков.

Ключевые слова: стафилококк, *Staphylococcus epidermidis*, штамм, пигмент, антибиотики

Для цитирования: Юсупов М.И. Сравнительная характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных от больных с различными поражениями кожи и от здоровых людей. Бактериология. 2022; 7(2): 45–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-45-46

Comparative characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with various skin lesions and from healthy people

M.I.Yusupov

Samarkand Medical University, Samarkand, Uzbekistan

Recently, reports have been increasingly appearing about the etiological role of the so-called «non-pathogenic» staphylococci, mainly *Staphylococcus epidermidis*, in a number of diseases: urinary tract, conjunctivitis in newborns, wound and purulent infections, acute gastroenteritis, endocarditis. A comprehensive microbiological examination of 146 people was carried out. Of these, there were 88 patients with skin diseases and 49 healthy individuals. A total of 428 strains were studied, the biological characteristics of coagulase-negative staphylococci were studied.

Key words: *Staphylococcus*, *Staphylococcus epidermidis*, strain, pigment, antibiotics

For citation: Yusupov M.I. Comparative characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with various skin lesions and from healthy people. Bacteriology. 2022; 7(2): 45–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-45-46

В практических лабораториях при идентификации стафилококков используется один из тестов – реакция плазмокоагуляции. Стафилококки, лишенные плазмокоагулазы, автоматически признаются безобидными комменсалами, не обладающими способностью вызывать патологический процесс [1, 2]. Вместе с тем в последнее время все чаще появляются сообщения об этиологической роли так называемых «непатогенных» стафилококков, в основном *Staphylococcus epidermidis*, в ряде заболеваний: мочевыводящих путей, конъюнктивитов у новорожденных детей, раневой и гнойной инфекций, острых гастроэнтеритов, эндокардитов

[3–6]. Коагулазоотрицательные стафилококки часто выделяются как со слизистой носоглотки, с кожи здоровых людей, так и из многочисленных объектов внешней среды [7].

Цель исследования – выявить биологические особенности коагулазонегативных стафилококков, выделенных от больных с различными поражениями кожи.

Материалы и методы

Было проведено комплексное микробиологическое обследование 146 человек, обратившихся в амбулаторию

Для корреспонденции:

Юсупов Машраб Исмтиллоевич, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Самаркандского медицинского университета

Адрес: 140100, Самарканд, ул. Амира Темура, 18

Телефон: (998 66) 233-0841

E-mail: mr.mash@mail.ru

Статья поступила 11.05.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Mashrab I. Yusupov, Assistant of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Samarkand Medical University

Address: 18 Amir Temur str., Samarkand, 140100, Republic of Uzbekistan

Phone: (998 66) 233-0841

E-mail: mr.mash@mail.ru

The article was received 11.05.2022, accepted for publication 30.06.2022

Сельского района г. Самарканда. Из них 88 были больные кожными заболеваниями, а 49 – здоровые лица. Материал для исследования забирался стерильным тампоном со следующих участков тела: слизистой губ, здоровой кожи передней поверхности грудной клетки, слизистой носа, зева и половых органов, а у больных – еще из очага кожного поражения. Посев производили на желточно-солевом агаре. После 48-часовой инкубации в термостате выросшие колонии пересевали на мясопептонный агар для дальнейшего изучения. У всех выделенных культур коагулазонегативных стафилококков изучали лецитовителлазную, ДНКазную, лизоцимную активности, пигментообразование, продукцию гемолизина, бактериоциногенность, фаголизательность и антибиотикограммы.

Результаты и обсуждение

Всего было изучено 428 штаммов. Изучена биологическая характеристика коагулазонегативных стафилококков. Оказалось, что 44,4% культур продуцировали ДНКазу, 39,7% – лизоцимоподобный фермент. Продукция α - и δ -гемолизина зарегистрирована у 42,0 и 39,0% штаммов соответственно, но ни один из 428 штаммов не продуцировал β -гемолизин. 18,4% оказались бактериоциногенными. Более четверти штаммов лизировались Международным набором стафилофагов, 51,6% культур обладали множественной лекарственной устойчивостью (пенициллин, стрептомицин, амоксицилин, гентомицин, цефазолин, цефатаксим). Лишь 8,8% культур образовывали палевый и золотистый пигмент.

Статистически достоверной разницы между частотой проявления отдельных биологических свойств культур, выделенных от здоровых людей и больных с поражениями кожи, установить не удалось. Исключение составляет продукция δ -гемолизина: у людей с поражениями кожи было обнаружено 43% таких штаммов, а у здоровых лиц – 32,7%. Разница статистически достоверна ($p < 0,05$).

Представлялось важным сопоставить частоту проявления отдельных признаков у культур коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных из различных участков тела обследованных лиц. Анализ результатов показывает, что штаммы, выделенные со слизистой половых органов, значительно чаще, чем изолированные из других участков тела обследованных, обладали ДНКазной активностью, способностью продуцировать α - и δ -гемолизин. Другие признаки проявлялись одинаково часто и у стафилококков, выделенных с других участков тела. Бактериоциногенная активность чаще отмечалась у штаммов, выделенных из зева.

Выводы

Важно отметить, что коагулазоотрицательные культуры, полученные из очагов кожных поражений, не отличались более высокой биологической активностью по сравнению с выделенными из других участков тела, что не позволяет считать эти микроорганизмы участниками, а тем более возбудителями кожных поражений у обследованных больных.

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. Хохлова ОЕ, Ивао Я, Камшилова ВВ, Поткина НК, Акушева ДН, Ямамото Т. Носительство и молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* среди студентов-медиков. Бактериология. 2021;6(1):25-31. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-1-25-31
2. Крамарь ВО, Климова ТН, Жарченко ЮВ, Панченко АВ, Блинцова ЛА. Экология стафилококков у практически здоровых людей и у больных стационаров крупного промышленного города. Успехи современного естествознания. 2011;5:104-6.
3. Стречунский ЛС, Белькова ЮА, Дехнич АВ. Внебольничные MRSA – новая проблема антибиотикорезистентности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005;7(1):32-46.
4. Белятич ЛИ, Зинченко ЛИ, Ключева Е.В. Метициллинрезистентные стафилококки среди возбудителей инфекции кожи и мягких тканей в гнойном хирургическом стационаре. Бактериология. 2021;6(3):26.
5. Решедько ГК, Авдеева ТГ, Иванчик НВ, Стунжас ОС. Антибиотикорезистентность штаммов *S.aureus*, выделенных у детей раннего возраста с инфекциями кожи и мягких тканей. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009;11(4):356-61.
6. Одилова ГМ, Юсупов МИ. Течение стафилококковых энтероколитов у детей раннего возраста. Проблемы биологии и медицины. 2021;5(130):158-9.
7. Николаева ИВ, Анохин ВА. Стафилококковые инфекции в педиатрии. Практическая медицина. 2010;1(40):24-27.

References

1. Khokhlova OE, Iwao Ya, Kamshilova VV, Potkina NK, Akusheva DN, Yamamoto T. Carriage and molecular-genetic features of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among medical students. Bacteriology. 2021;6(1):25-31. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-1-25-31 (In Russian).
2. Kramar VO, Klimova TN, Zharchenko YuV, Panchenko AV, Blintsova LA. Ecology of staphylococci in practically healthy people and in patients in hospitals of a large industrial city. Advances in Current Natural Sciences. 2011;5:104-6. (In Russian).
3. Strachunsky LS, Belkova YuA, Dekhnich AV. Community-acquired MRSA is a new antibiotic resistance problem. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2005;7(1):32-46. (In Russian).
4. Belyatich LI, Zinchenko LI, Klyueva EV. Methicillin-resistant staphylococci among pathogens of skin and soft tissue infections in a purulent surgical hospital. Bacteriology. 2021;6(3):26. (In Russian).
5. Reshedko GK, Avdeeva TG, Stunzhas OS, Ivanchik NV. Antimicrobial resistance of *S. aureus* isolated from infants with skin and soft tissue infections. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2009;11(4):356-61. (In Russian).
6. Odilova GM, Yusupov MI. The course of staphylococcal enterocolitis in young children. Problems of Biology and Medicine. 2021;5(130):158-9. (In Russian).
7. Nikolaeva IV, Anokhin VA. Staphylococcal infections in pediatrics. Practical Medicine. 2010;1(40):24-27. (In Russian).

Клиническая картина детской скарлатины в Узбекистане

С.А.Низамова, Б.М.Таджиев

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Ташкент, Республика Узбекистан

В работе исследовали клинические особенности течения скарлатины у детей, госпитализированных во 2-м отделении 1-й Государственной инфекционной больницы. Охарактеризованы распределение пациентов по возрасту, организации (дошкольники, школьники, неорганизованные), характеру течения заболевания. На основе проведенных клинических исследований больных сделан вывод о том, что на сегодняшний день скарлатина у детей носит типичный характер и имеет все классические клинические симптомы.

Ключевые слова: скарлатина у детей, клиническая картина

Для цитирования: Низамова С.А., Таджиев Б.М. Клиническая картина детской скарлатины в Узбекистане. Бактериология. 2022; 7(2): 47–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-47-49

Clinical picture of children' scarlet fever in Uzbekistan

S.A.Nizamova, B.M.Tadiyev

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Tashkent, Republic of Uzbekistan

The clinical features of the course of scarlet fever in children hospitalized in the 2nd department of the 1st State Infectious Diseases Hospital have been investigated in the paper. The distribution of patients by age, organization (preschoolers, schoolchildren, unorganized), the nature of the course of the disease were characterized. Based on the clinical studies of patients, it was concluded that today scarlet fever in children is typical and has all the classic clinical symptoms.

Key words: scarlet fever in children, clinical picture

For citation: Nizamova S.A., Tadiyev B.M. Clinical picture of children' scarlet fever in Uzbekistan. Bacteriology. 2022; 7(2): 47–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-47-49

Скарлатина, симптомы которой известны человечеству на протяжении многих веков, является опасным заболеванием, вызываемым стрептококками *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А), которые относятся к группе гемолитических стрептококков. Этот вид бактерий также способен вызывать хронический тонзиллит, переходящий в ревматические заболевания, стрептодермию, гломерулонефрит. Долгое время скарлатину не отличали от аналогичных заболеваний, сопровождающихся сыпью, и только в конце XVII века болезнь была тщательно изучена и описана. Из-за характерного симптома – ярко-красного цвета языка и слизистой оболочки полости рта, фиолетового цвета мелкой сыпи – была названа скарлатиной (пурпурной лихорадкой). Источником инфекции при данном заболевании являются больные с различными признаками стрептококковой инфек-

ции [1]. На современном этапе, несмотря на патогенетическую терапию, использование современных антибиотиков, скарлатина продолжает оставаться актуальной проблемой современной медицины. Учитывая наибольшую распространенность среди детей дошкольного и школьного возраста, необходимо отметить, что дети, посещающие дошкольные учреждения, заболевают чаще, чем дети, находящиеся в домашних условиях, что связано со скученностью детей и различными механизмами передачи – воздушно-капельным, контактно-бытовым и пищевым [2, 3]. Опасность распространения данной инфекции связана с отсутствием специфической профилактики и риском развития ревматических заболеваний, гломерулонефрита [4].

Цель данной работы – исследовать особенности клинической картины скарлатины у детей.

Для корреспонденции:

Низамова Саодат Абдукадировна, старший научный сотрудник Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний

Адрес: 100133, Республика Узбекистан, Ташкент, Учтепинский район, ул. Заковат, 49
E-mail: nizsaodat88@gmail.com

Статья поступила 09.03.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Saodat A. Nizamova, Senior Researcher of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases

Address: 49 Zakovat str., Uchtepa district, Tashkent, 100133, Republic of Uzbekistan
E-mail: nizsaodat88@gmail.com

The article was received 09.03.2022, accepted for publication 30.06.2022

Материалы и методы

Для решения поставленной цели нами изучены клинические особенности течения скарлатины у детей, госпитализированных во 2-м отделении 1-й Государственной инфекционной больницы.

Результаты и обсуждение

Средний возраст пациентов со скарлатиной составил $6,35 \pm 0,64$ года (рис. 1), с преобладанием детей от 3 до 6 лет (20, 43,48%). При этом девочек было 24 (52,17%), мальчиков – 22 (47,83%).

Детские дошкольные учреждения посещали 10 (21,77%) детей, школу – 18 (39,13%), долю неорганизованных детей составили также 18 (39,13%) больных (рис. 2).

Заболевание у всех детей начиналось остро, с повышения температуры до $39-40^{\circ}\text{C}$ у 7 ($15,22 \pm 0,57\%$) больных, до 38°C у 20 ($43,48 \pm 0,97\%$) и до 37°C у 19 ($41,30 \pm 0,95\%$).

Больных при поступлении беспокоила общая слабость ($42, 91,30 \pm 1,40\%$), сыпь ($45, 99,83 \pm 1,45\%$), боль в горле ($40, 90,43 \pm 1,32\%$), ухудшение аппетита ($30, 80,87 \pm 1,15\%$), ухудшение сна ($30, 80,87 \pm 1,15\%$), тошнота ($8, 17,39 \pm 0,61\%$), рвота ($6, 13,04 \pm 0,53\%$), головокружение ($2, 4,35 \pm 0,31\%$) (рис. 3).

У 72,4% больных сыпь появилась в первый день заболевания, у 27,6% – на 2–3-й день. У всех пациентов сыпь мелкоточечная, расположена на фоне гиперемии кожи, чаще всего на лице, кроме носогубного треугольника, на туловище и сгибательных поверхностях конечностей, со сгущением в области складок. Сыпь исчезала через 3–5 дней, в среднем $4,21 \pm 1,09$ дня, не оставляя пигментации. У небольшой части больных (18,7%) отмечалось мелкое шелушение на лице, туловище.

У 82,4% больных отмечалось увеличение подчелюстных лимфатических узлов до 1–1,5 см, узлы при пальпации эластичные, безболезненные.

У 30,07% больных отмечалось увеличение печени (на 1,0–2,0 см выступала из-под края реберной дуги), увеличение селезенки не отмечалось.

Гиперемия и умеренное увеличение небных миндалин отмечались у 68,4% пациентов, выраженная гиперемия и гипертрофия небных миндалин – у 32,6% больных. У большинства больных (56,8%) ангина имела лакунарный характер, реже отмечалась катаральная и фолликулярная форма.

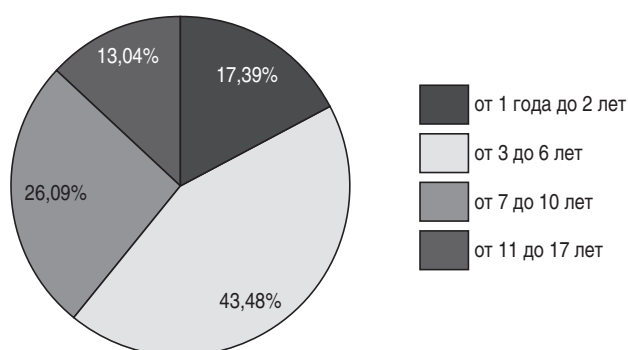


Рис. 1. Распределение больных по возрасту.

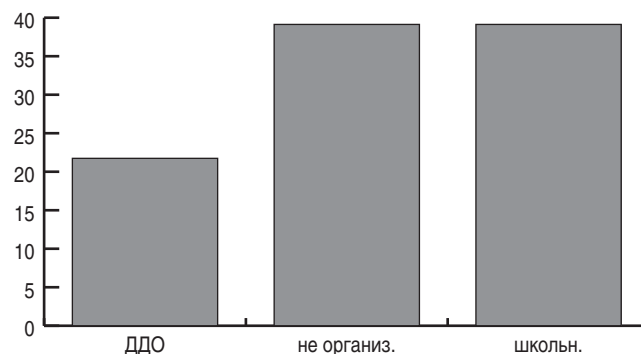


Рис. 2. Уровень организованности детей.

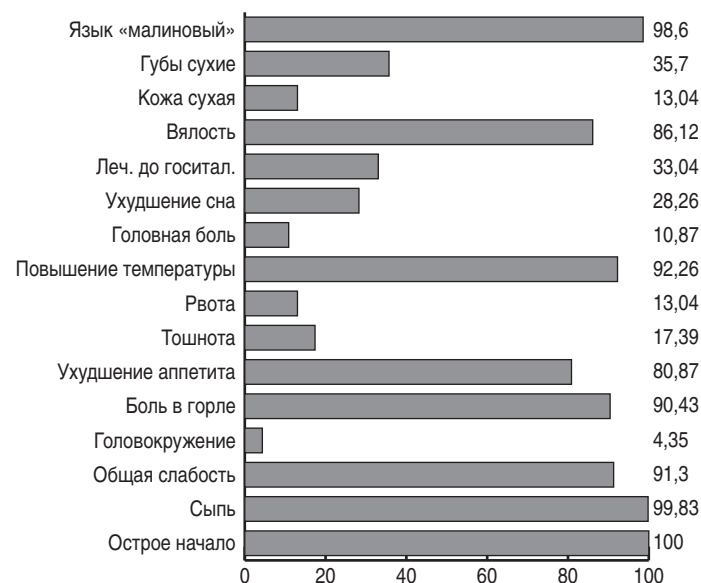


Рис. 3. Клинические признаки больных скарлатиной, %.

У 86,4% больных на 3–4-е сутки заболевания наблюдался «малиновый» язык.

При анализе данных периферической крови отмечается невыраженный лейкоцитоз (среднее значение лейкоцитов $9,28 \times 10^9$) и сдвиг лейкоцитарной формулы влево у 37,5% детей; увеличение скорости оседания эритроцитов до 10 мм/ч – у 39,7%.

Все больные получали антибактериальную терапию по схеме: пенициллин 1 г 3 раза в день. Средняя продолжительность курса 7 дней.

По данным лечения у всех пациентов не выявлено никаких осложнений, среднее число койко-дней – 8.

Все дети были выписаны с улучшением под наблюдение участкового врача.

Таким образом, субъективные и объективные данные проведенных клинических исследований больных скарлатиной показывают, что на сегодняшний день скарлатина носит типичный характер и имеет все классические клинические симптомы.

Информация о финансировании

Бюджетное финансирование.

Financial support

Budget financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Астапов АА, Манкевич РН Учебно-методическое пособие БГМУ. 2014;40(3):10.
2. Кузьменкова ВВ, Семенченко ЕВ. Клиническая картина скарлатины на современном этапе. Молодой ученый. 2020;14(304):111-3.
3. Жолдошбекова ЖЖ, Шайымбетов АТ. Скарлатина у детей на современном этапе. Вестник КГМА им. И.К.Ахунбаева. 2017;1:161-4.
4. Илунина ЛМ, Кокорева СП, Стахурлова СЕ, Клемятина Ю. Клиническая характеристика современной скарлатины у детей, госпитализированных в стационар. Научно-практический журнал. 2017;20(3):128-32.

References

1. Astapov AA, Mankevich RN. Educational and methodological manual of BSMU. 2014;40(3):10. (In Russian).
2. Kuzmenkova VV, Semenchenko EV. The clinical picture of scarlet fever at the present stage. Young Scientist. 2020;14(304):111-3. (In Russian).
3. Dzoldoshbekova JJ, Shaiymbetov AT. Scarlet fever in children in modern time. Bulletin of KSMA im. I.K.Akhunbaeva. 2017;1:161-4. (In Russian).
4. Ilunina LM, Kokoreva SP, Stakhurlova SE, Klemyatina EYu. Clinical characteristics of modern scarlet fever in children hospitalized in a hospital. Scientific and Practical Journal. 2017;20(3):128-32. (In Russian).

Информация об авторе:

Таджиев Ботир Мирхошимович, доктор медицинских наук, директор Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний

Information about author:

Botir M. Tadiyev, MD, PhD, DSc, Director of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases

НОВОСТИ НАУКИ

Пристальный взгляд на возникновение устойчивости к антибиотикам в биоаэрозолях

Несмотря на серьезную озабоченность общественного здравоохранения в отношении инфекционных заболеваний в воздушной среде, потенциально опасным микробиологическим индикаторам, таким как гены устойчивости к антибиотикам (ARG) в биоаэрозолях, не уделяется существенного внимания. Традиционно исследования биоаэрозолей были сосредоточены на характеристике микробных сообществ; однако недавно возникла более серьезная проблема из-за присутствия ARG в биоаэрозолях, что привело к увеличению распространенности горизонтального переноса генов (HGT). Это представляет собой процесс, посредством которого бактерии переносят гены в другие среды окружающей среды и, следовательно, вызывают инфекционное заболевание. Устойчивость к антибиотикам в водной и почвенной средах широко изучалась в последние несколько лет с применением передовых молекулярных и биотехнологических методов. Однако ARG в биоаэрозолях не привлекали особого внимания. Кроме того, профилирование ARG и HGT в воздушной среде сильно ограничено в полевых исследованиях из-за отсутствия подходящих методологических подходов. Таким образом, это исследование всесторонне описывает последние результаты опубликованных исследований и некоторые соответствующие молекулярные и биотехнологические методы мониторинга устойчивости биоаэрозолей к антибиотикам. Кроме того, в этом обзоре обсуждаются основные пробелы в знаниях относительно текущих методологических вопросов и будущих направлений исследований.



Lee G, Yoo K.

A review of the emergence of antibiotic resistance in bioaerosols and its monitoring methods. Rev Environ Sci Biotechnol. 2022 Jun 6:1-29. DOI: 10.1007/s11157-022-09622-3

Clostridioides difficile – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита

Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова

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

Обзор посвящен особенностям биологии возбудителя *Clostridioides difficile*-инфекции, позволяющим ему персистировать в организме человека, длительно сохраняться во внешней среде и вызывать тяжелые поражения толстого кишечника у больных пациентов. Представлены данные о морфологии, структуре и функциях S-слоя и других макромолекулах клеточной стенки микроба. Рассматриваются процессы спорообразования и прорастания спор, их строение, а также процесс образования биопленки. Описаны токсины TcdA, TcdB и CDT: их структура, генетический контроль и молекулярные механизмы поражающего действия. Дана характеристика генома и мобильных генетических элементов (МГЭ) *C. difficile*, описано их участие в изменчивости, адаптации и эволюции патогена. Представлены данные об антибиотикорезистентности *C. difficile* и роли МГЭ в ее распространении среди *C. difficile*. Подробно описан патогенез инфекции. Уникальные свойства патогена свидетельствуют о его весьма высоком патогенном потенциале и больших трудностях борьбы с ним.

Ключевые слова: *Clostridioides difficile*, псевдомембранозный колит, патогенез, токсины, мобильные генетические элементы

Для цитирования: Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К. *Clostridioides difficile* – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. Бактериология. 2022; 7(2): 50–63. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-50-63

Clostridioides difficile is the causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis

B.V.Eruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova

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

The review is devoted to the peculiar properties of the agent for *Clostridioides difficile*-infection, allowing persisting in the human body for a long time as well as in the extremal environments and causing the severe lesions of the colon in the patients. Data on morphology, structure and functions of the S-layer and other macromolecules of the microbe cell wall are presented. The processes of spore formation and germination, their structure as well as the process of biofilm formation are considered. The toxins TcdA, TcdB and CDT are described: structure, genetic control and molecular mechanisms of action. The genome and mobile genetic elements (MGE) of *C. difficile*, their participation in the variability, adaptation, and evolution of the pathogen are characterized. Data on the antibiotic resistance of *C. difficile* and role of MGE in *C. difficile* dissemination are presented. The pathogenesis of the infection is described in detail. The unique properties indicate high pathogenic potential and the great difficulties to combat *C. difficile*.

Key words: *Clostridioides difficile*, pseudomembranous colitis, pathogenesis, toxins, mobile genetic elements

For citation: Eruslanov B.V., Svetoch E.A., Mitsevich I.P., Fursova N.K. *Clostridioides difficile* is the causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. Bacteriology. 2022; 7(2): 50–63. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-50-63

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 11.05.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

The article was received 11.05.2022, accepted for publication 30.06.2022

C*lostridioides difficile* – возбудитель тяжелой нозокомиальной (госпитальной) инфекции, *C. difficile*-инфекции (КДИ), которая сопровождается водянистой диареей и нередко опасным для жизни человека поражением толстого кишечника – псевдомембранозным колитом. *C. difficile* – грамположительный анаэробный спорообразующий токсин-продуцирующий микроб, сравнительно широко распространенный во внешней среде. Основным местом обитания и резервуаром патогена является кишечный тракт человека и животных (свиней, птицы, представителей семейства кошачьих). Особо опасным источником *C. difficile* являются клинически больные (с диареей) пациенты и больные новорожденные животные (чаще всего поросята, телята). Споры возбудителя могут долго сохраняться во внешней среде – в почве, водных источниках, в помещениях, на предметах и инструментарии лечебных учреждений, а также на животноводческих фермах.

Человек инфицируется *C. difficile* фекально-оральным путем. Кишечный тракт примерно 5% взрослых и 15–70% младенцев колонизирован *C. difficile*. Наибольший уровень колонизации кишечного тракта патогеном отмечается у лиц пожилого возраста, длительно находящихся на лечении [1]. Болезнь особенно тяжело протекает у пожилых и иммунокомпрометированных людей. Инфекция у госпитализированных пациентов, как правило, ассоциируется с текущей или предшествующей госпитализации интенсивной антибиотикотерапией больного.

Культура *C. difficile* впервые была выделена Hall и O'Toole из стула здорового новорожденного ребенка в 1935 г. [2]. Первоначально (после открытия) микроб считали представителем нормальной микрофлоры кишечника человека, однако уже в 1970-е гг., в период интенсивного использования антибиотиков в клинической практике, *C. difficile* был признан одним из этиологических агентов заболеваний толстого кишечника человека [3]. В 1974 г. Tedesco et al. сообщили, что у 21% госпитализированных пациентов, получавших клиндамицин, развилась водянистая диарея и у половины из них при эндоскопическом обследовании на слизистой толстой кишке были обнаружены псевдомембраны, из которых удалось выделить культуру *C. difficile* [4]. В последующие годы число случаев КДИ в мире увеличивалось, и в настоящее время болезнь является одной из значимых нозокомиальных инфекций во многих странах, особенно часто ее регистрируют в США и Канаде [5, 6].

Систематика и номенклатура

Вид *C. difficile*, ранее известный как *Clostridium difficile*, принадлежит к роду *Clostridioides*, семейству *Peptostreptococcaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, типу *Firmicutes*, домену *Bacteria*. Свое новое официальное название вид получил только в 2016 г. [7, 8]. Новое таксономическое название возбудителя отражает его генетическое и биологическое отличие от видов рода *Clostridium*. Показано, что нуклеотидные последовательности 16S рРНК типичного вида рода *Clostridium* – *C. butyricum*, а также видов *C. perfringens* и *C. tetani* – значительно отличаются от нуклеотидных последовательностей 16S рРНК вида *C. difficile*. Тем не менее следует заметить, что старое название возбудителя КДИ – *Clostridium difficile* – и сейчас широко используется в научной литературе [9].

Культуральные и морфологические свойства

Вегетативные клетки *C. difficile*, выращенные на питательной среде и окрашенные по Граму, имеют форму палочек с закругленными концами различной длины (3,0–16,9 мкм) и ширины (0,5–1,9 мкм). Морфология и величина микроба зависят от штамма, питательной среды и других условий выращивания. Образующиеся в клетках споры располагаются субтерминально. Экзоспоры *C. difficile* имеют короткую палочковидную (овоидную) форму. Морфология вегетативных клеток и их экзоспор при сканирующей электронной микроскопии представлена на рис. 1.

У подвижных форм *C. difficile* на поверхности клеточной стенки видны перитрихально расположенные жгутики. *C. difficile* – гетеротрофы, они хорошо растут на богатых питательных средах, оптимальная температура для их роста 37°C. Молодые культуры *C. difficile* окрашиваются грамположительно, старые могут окрашиваться грамотрицательно. Характерным для *C. difficile* является большое морфологическое разнообразие образуемых ими на плотных питательных средах колоний (плеоморфизм). Варьирует не только форма колоний, но и их величина: от крупных (4–6 мм) до мелких (карликовых), возникающих из прорастающих спор [11]. Форма колоний изменяется по мере увеличения времени выращивания культуры, спустя 72 ч роста у культуры начинается споруляция. Тем не менее, несмотря на имеющийся место у *C. difficile* плеоморфизм, большинство штаммов патогена на средах с кровью и на селективно-элективном агаре CCFA (циклосерин-цефокситин-фруктозный агар) образуют характерные неправильной формы плоские или слегка приподнятые, имеющие вид матового стекла колонии величиной 3–5 мм, которые спустя 48–72 ч роста, из-за приподнятого беловато-сероватого центра, приобретают вид «жареного яйца» (рис. 2).

На кровяных агаровых средах колонии имеют синевато-зеленый оттенок. Под ультрафиолетовым светом они флуоресцируют зеленовато-желтым светом. Рост *C. difficile* на селективных средах сопровождается образованием едкого запаха, похожего на конский навоз. Появление характерного запаха объясняется способностью *C. difficile* образовывать изовалериановую и изокапроевую кислоты, а также п-крезол. Вследствие такой способности *C. difficile* может противостоять действию 0,5%-го п-крезола, что отличает этот микроб от других клостридий, рост которых ингибируется указанной концентрацией п-крезола [12].

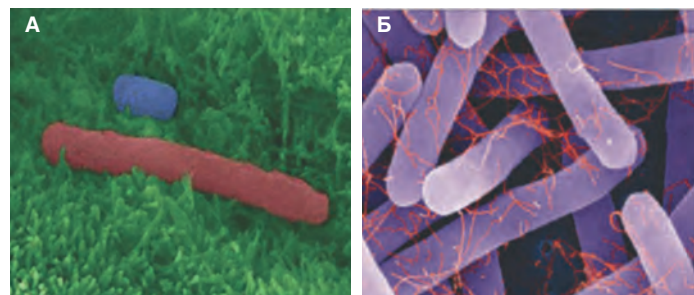


Рис. 1. Сканирующая электронная микрофотография: А – споры (синий цвет) и вегетативные клетки (красный цвет) *C. difficile*, адсорбированные на микроворсинках эпителиальных клеток кишечника человека (зеленый цвет); Б – вегетативные клетки (синий цвет) и жгутики (красный цвет) *C. difficile* [10].

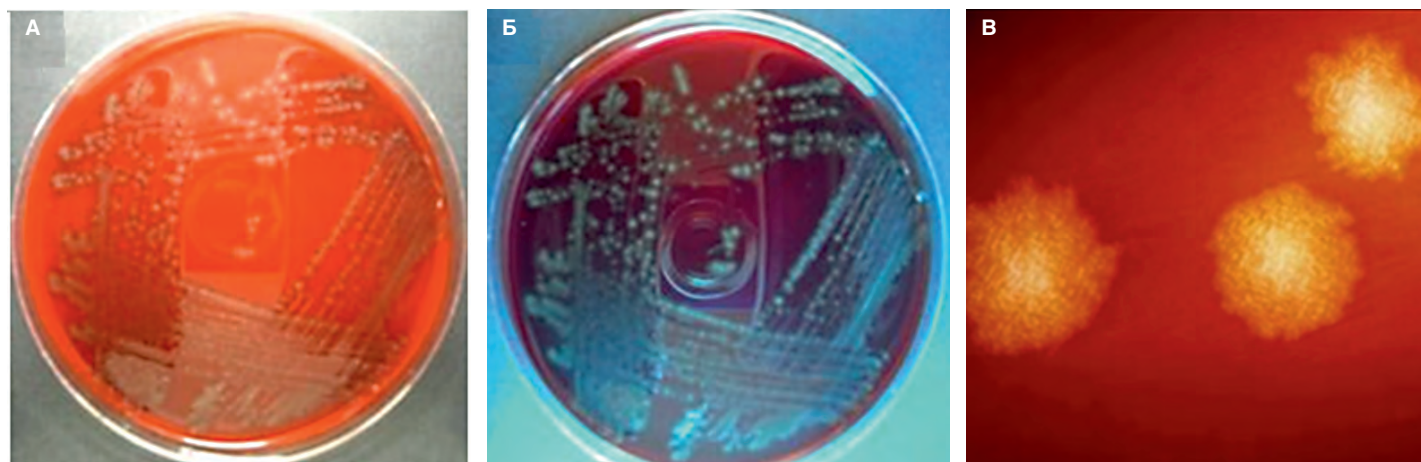


Рис. 2. Культура *C. difficile* на плотной питательной среде CCFA: А – под белым светом; Б – в ультрафиолетовом свете; В – отдельные колонии с характерными лопастными краями (<https://www.nist.gov/image/phil3647cdc-dr-holdemajpg>).

Структурная организация вегетативных клеток

Морфология и химический состав вегетативных клеток *C. difficile* имеют свои особенности, которые во многом определяют биологические и патогенетические свойства возбудителя. Отличительным признаком клеток *C. difficile* является наличие у них S-слоя, представляющего собой белковую паракристаллическую структуру, которая окружает (покрывает) всю клеточную поверхность микроба. S-слой играет важную роль в адгезии патогена к слизистой толстой кишки человека, в биопленкообразовании, а также в защите *C. difficile* от литических бактериофагов и иммунной системы хозяина [13].

Основной химической структурой S-слоя *C. difficile* является комплекс SLP белков (synaptotagmin-like proteins). Этот комплекс состоит из двух групп протеинов – высокомолекулярных (high molecular weight/HMW) с массой 40kDa и низкомолекулярной (low molecular weight/LMW) с массой 35 kDa. Белки LMW *C. difficile* – это хорошие иммунодоминантные антигены, которые легко распознаются клетками иммунной системы человека и являются сильным индуктором гуморального иммунного ответа. Этим, по-видимому, объясняется факт частого обнаружения в сыворотке крови переболевших КДИ антител к белкам LMW. Исследователи отмечают высокие штаммовые различия в структуре аминокислотных последовательностей белков LMW, что существенно ограничивает иммунологическую перекрестную реактивность между штаммами *C. difficile*. Благодаря антигенной гетерологичности LMW-белков они являются основой для серотипирования *C. difficile*; в настоящее время вид включает 21 серогруппу [14]. Вариативность антигенной структуры LMW-белков придает виду эволюционные преимущества, увеличивая его возможность противостоять иммунной системе человека и животных.

Высокомолекулярные белки HMW S-слоя отличаются от LMW-белков высокой консервативностью: их аминокислотные последовательности у различных штаммов *C. difficile* на 70–71% идентичны между собой, то есть являются иммунологически перекрестно реактивными. Иммунологическая реактивность LMW- и HMW-белков S-слоя позволяет рассматривать их и сам S-слой в качестве кандидатных антигенных субстанций при конструировании вакцины против КДИ [15].

Бактерии большинства изолятов *C. difficile* имеют пили и жгутики – структуры белковой природы. Пили представлены короткими нитями, расположенными на всей поверхности клетки. Они принимают участие в адгезии патогена и в образовании им биопленки [16]. Жгутики *C. difficile* расположены на клетке перитрихально и выполняют ряд функций, позволяющих рассматривать жгутики в качестве важного фактора вирулентности возбудителя КДИ. Жгутики способствуют адгезии патогена и колонизации им толстого кишечника. Показано, например, что препараты неочищенных жгутиков, выделенных из клеток *C. difficile* определенной серогруппы, в 10 раз сильнее прилипали к слизистой слепой кишки мыши, чем нефлагеллированные штаммы *C. difficile*, относящиеся к той же серогруппе [17]. Жгутики обеспечивают движение *C. difficile* к источникам питания и одновременно способствуют распространению патогена в кишечном тракте. Они ассоциированы с агрегацией клеток микроба и образованием им биопленок, а также с распознаванием патогена иммунной системой человека через рецептор TLR5 [18]. Кроме того, недавно была установлена прямая связь между регуляцией синтеза жгутиков и выработкой клетками *C. difficile* токсинов [19]. Жгутики *C. difficile* кодируются тремя оперонами: F1, F2 и F3. Gupta et al., исследуя функцию генов данных оперонов, подтвердили важную роль жгутиков в подвижности *C. difficile*, в агрегации их клеток, образовании биопленок, адгезии и распознавании их иммунной системой человека через рецептор TLR5 [20].

Важными структурами клеточной стенки *C. difficile* являются пептидогликановый слой и полисахариды. Пептидогликан – основной компонент клеточной стенки, определяющий многие свойства патогена. В частности, он обуславливает высокую устойчивость *C. difficile* к лизоциму, одному из гуморальных факторов врожденного иммунитета. Эта устойчивость объясняется высоким содержанием в пептидогликане N-деацетилированных остатков Glc NAc в цепи гликана [21]. Изменения в структуре пептидогликана могут стать причиной устойчивости *C. difficile* к β-лактамам антибиотикам. Пептидогликан – основная мишень для иммунной системы человека и животных: он активирует макрофаги, инициирует активацию комплемента через альтернативный путь, стимулирует образование фактора некроза опухоли (TNF-α) и синтез антител.

На поверхности клеточной стенки *C. difficile* можно обнаружить два типа полисахарида – PS-I и PS-II. Полисахарид PS-I встречается крайне редко, в то время как PS-II выявляется у многих штаммов. Недавно полисахарид PS-II был химически синтезирован и предлагается исследователями в качестве потенциального протективного антигена при разработке вакцины против КДИ [22].

Споруляция

Попадая в неблагоприятные условия (недостаток питательных веществ, аэробные условия), вегетативная клетка *C. difficile* способна образовывать споры, которые, благодаря высокой устойчивости к химическим и физическим факторам, могут длительное время (несколько месяцев) сохраняться во внешней среде, представляя потенциальную опасность для людей и животных. На рис. 3 представлена фотография спор *C. difficile* и схема строения споры, состоящей из экзоспориума, наружной мембраны, кортекса, зародышевой клеточной стенки и внутренней мембраны; в центре споры располагается ядро, сформированное ДНК (на схеме отсутствует).

Процесс формирования споры в вегетативной клетке начинается с деления ее с помощью перегородки на две ассиметричные половины – большую (материнскую) и меньшую (дочернюю), каждая из которых содержит копию хромосомы. В меньшей половине клетки начинается формирование вышеуказанных слоев споры. На стадии образования споры большая, материнская, половина поглощает меньшую. Здесь, в цитоплазме материнской клетки, происходит окончательное созревание споры. После ее созревания материнская клетка лизируется, спора освобождается и вместе с фекальными массами попадает во внешнюю среду, где она может находиться в состоянии покоя до тех пор, пока не появятся благоприятные условия для ее прорастания [23]. В процессе споруляции *C. difficile*, на ее ранней стадии, важную, если не главную, роль играет ген, подобный гену *SpoOA*, контролирующему у *Bacillus subtilis* формирование спор. Показано, что штамм *C. difficile* с мутантным геном, аналогичным *SpoOA*, способен вызывать заболевание у мышей, но не способен формировать споры, долго персистировать в организме мышей и заражать других животных [24].

В наружном слое оболочки спор идентифицировано три белка *C. difficile*: CofCB, CofD и CofE. Белки CofCB и CofD функционируют как марганцевые каталазы, а CofE – как бифункциональный белок с активностью пероксиредиксина и хитиназы, который, как полагают, играет роль в сборке оболочки споры посредством белка-мономер. Однако точная функция этих белков пока не выяснена [25].



Рис. 3. Строение споры *C. difficile*: А – схема; Б – электронно-микроскопическое изображение [10].

При попадании в организм человека или животного споры *C. difficile*, благодаря высокой устойчивости к соляной кислоте и ферментам желудка, неповрежденными попадают в тонкий кишечник, где и происходит процесс их прорастания. Прорастание спор начинается с их регидратации, высвобождения катионов (H^+ , Na^+ , K^+) и дипиколината кальция, что приводит к гидролизу слоя пептидогликана споры. С увеличением воды в споре происходит расширение ядра споры и увеличивается ее ферментативная активность. Ферменты прорастания у *C. difficile* изучены недостаточно, однако они хорошо охарактеризованы у *C. perfringens*. Такими ферментами являются белки SleB и CwlJ, известные как кортексические ферменты спор (SCLE). Белок CwlJ расщепляет слои пептидогликана, механизм гидролитической активности SleB остается неизвестным. Имеются и другие ферменты, участвующие в прорастании спор *C. perfringens* – белки SlrC, SleM. Sebaitria et al. идентифицировали в геноме штамма *C. difficile* CD630 гены, гомологичные генам *cwlJ* и *sleB* *B. subtilis* 3563 и генам *sleC* *C. perfringens* CD0551 [26].

Важную роль в прорастании спор *C. difficile* *in vivo* играют индукторы – химические вещества различной природы. Показано, что индукторами прорастания спор могут выступать желчные кислоты, желатин, таурохолат и гликолят. Например, нормальная физиологическая концентрация таурохолата натрия в двенадцатиперстной кишке (6,9 ммоль) является благоприятной для прорастания спор *C. difficile*. Стимулирует прорастание спор *C. difficile* глицин, поверхностно-активные вещества, лизоцим, пептидогликан, дипиколиновая кислота, аспарагин, глюкоза, фруктоза и калий. В активации процесса прорастания спор большое участие принимают описанные у *C. difficile* три сенсорных рецептора – GerA, GerB и GerK, расположенные на внутренней мембране споры. Если прорастание споры началось, то процесс превращения ее в вегетативную клетку остановить невозможно. Помимо индукторов прорастания спор в кишечном тракте присутствуют и ингибиторы прорастания. Одним из таких ингибиторов является препарат хемодезоксихолата, который предотвращает прорастание спор в присутствии таурохолата и холата. Другим ингибитором прорастания спор *in vivo* является холестирамин – производное желчных солей, отвечающий за удаление избытка солей желчных кислот из нижних отделов пищеварительного тракта [27]. Холестирамин, благодаря его ингибиторным свойствам, применяют для лечения КДИ. Однако лечебная эффективность холестирамина продолжает обсуждаться, поскольку его прием больными существенно увеличивает у них синтез желчных кислот (в 42–46 раз). Кроме того, холестирамин связывается с ванкомицином, снижая его антимикробную активность [28].

Факторы вирулентности

Штаммы *C. difficile*, возбудители КДИ, как правило, являются носителями значительного числа факторов вирулентности, к которым относятся белки S-слоя, клеточные поверхностные белки, многочисленные ферменты и токсины (таблица).

Тем не менее среди перечисленных факторов основную роль в патогенезе КДИ играют токсины, которые повреждают эпителиальные клетки толстой кишки и вызывают их ги-

Таблица. Факторы вирулентности <i>C. difficile</i>				
Фактор вирулентности	Механизм действия	Результат действия фактора вирулентности	Ссылка	
Токсин TcdA (энтеротоксин). Токсин TcdB (цитотоксин)	Глюкозилирование и инактивация системы Rho в энтероцитах толстой кишки. Повреждение межклеточных контактов энтероцитов, которое приводит к повышенной эпителиальной проницаемости. Повышенный синтез провоспалительных цитокинов интерлейкина-8 и интерферона- γ	Полимеризация актина, разрушение межклеточных соединений, гибель энтероцитов толстого кишечника. Токсичность TcdB в 100–1000 раз сильнее токсина TcdA	[29–31]	
Бинарный токсин CDT	Два отдельных олигопептида – компоненты A (CDT-A) и B (CDT-B). CDT-B способствует проникновению CDT-A в цитоплазму энтероцита. CDT-A – АДФ-рибозилтрансфераза – переносит радикал АДФ-рибозы на молекулы актина эпителиальной клетки	Полная деградация актинового скелета энтероцитов, завершающаяся их гибелью. Повышенная патогенность <i>C. difficile in vivo</i> и <i>in vitro</i>	[32]	
Биопленка	Место накопления <i>C. difficile</i> совместно с многовидовым сообществом бактерий. Накопление токсинов и биомассы <i>C. difficile</i> , регулируемых системой сенсинг-кворум. Накопление спор <i>C. difficile</i>	Длительная персистенция в организме. Снижение чувствительности <i>C. difficile</i> к антибиотикам	[33–35]	
SlpA (белок A S-слоя)	Фибронектин-связывающий белок A. Молекулярные механизмы адгезии, которые не установлены	Повышенная адгезия патогена к слизистой оболочке кишечника	[33]	
Cwp84 (белок клеточной стенки <i>C. difficile</i> с мол. массой 84 kDa)	Деградация нескольких внеклеточных белков матрикса (фибронектина, ламинина и витронектина). Образование более прочной биопленки у штаммов <i>C. difficile</i> , связанной с Cwp84	Повышение адгезии и колонизации <i>C. difficile</i> энтероцитов толстой кишки. Увеличение вирулентности и адгезии патогена к энтероцитам, рецидив КДИ	[33]	
Пили и жгутики	Подвижность <i>C. difficile</i> , агрегация клеток, образование биопленок, адгезия и распознавание их иммунной системой человека через рецептор TLR5	Адгезия и колонизация патогеном кишечника хозяина и в образовании им биопленок	[16–21]	
Споры	Участие регулятора споруляции SpoOA в спорообразовании и формировании биопленки	Персистенция <i>C. difficile</i> в организме хозяина и во внешней среде, устойчивость к антимикробным препаратам, развитие рецидива КДИ	[23–27]	

бель. У *C. difficile* описано три основных токсина: токсин А (TcdA – энтеротоксин), токсин В (TcdB – цитотоксин) и бинарный токсин CDT. Если первые два токсина (А и В) детектируют у большинства клинических штаммов (одновременно оба или только один из двух), то бинарный токсин CDT встречается, по данным разных авторов, у 5–30% вирулентных штаммов *C. difficile* [11]. Токсины А и В принадлежат к большому семейству клостридиальных токсинов (FCT), активность которых направлена на гуанин-трифосфатазу, ответственную за регуляцию актин-зависимых функций цитоскелета клеток [36]. Токсины TcdA и TcdB – одноцепочечные белки с высокой молекулярной массой (250–308 kDa), в которых различают четыре функциональных домена, описываемых как «ABCD-модель» токсина. На N-концевом участке токсина локализован ферментативно-активный домен А («А» – enzymatic activity), отвечающий за гликозилирование белков энтероцитов. За доменом А следует домен С («С» – cutting) – протеаза, обеспечивающая автокаталитическое отщепление от молекулы токсина домена А. Домен D («D» – delivery) находится между доменами С и В и обеспечивает транслокацию молекулы токсина через мембрану эндосомы в цитоплазму энтероцита. После домена С следует домен В («В» – binding), С-концевая часть которого отвечает за связывание токсина с рецепторами клеток-мишеней человека, а также за образование пор в их мембране. Рецептор-связывающий домен состоит из 20–40 коротких, содержащих от 20 до 50 аминокислот, олигопептидов, которые обеспечивают связывание токсина с липополисахаридами энтероцитов. Эти короткие повторяющиеся олигопептиды известны как CROPS-олигопептиды («CROPS» – the combined repetitive oligopeptides), структура которых специфична для отдельных изолятов *C. difficile* (рис. 4).

Рецепторами токсина TcdA являются поверхностный белок сахаразо-изомальтоза и поверхностный гликопротеин из семейства тепловых шоковых белков gp96 клеток-мишеней [30]. Для токсина TcdB рецепторами служат несколько белков энтероцитов: хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), NECTIN3 (мембранный белок, участвующий в образовании межклеточных адгезивных контактов) и белки из семейства G-белковых рецепторов [29].

После взаимодействия с рецептором токсины проникают в клетку путем так называемого клатрин-зависимого эндоцитоза. Низкое pH содержимого эндосомы приводит к структурной реорганизации токсинов и встраиванию гидрофобных участков TcdA и TcdB в мембрану эндосомы с последующей транслокацией доменов А и С в цитоплазму. В цитоплазме домен А отщепляется от молекулы токсина и взаи-

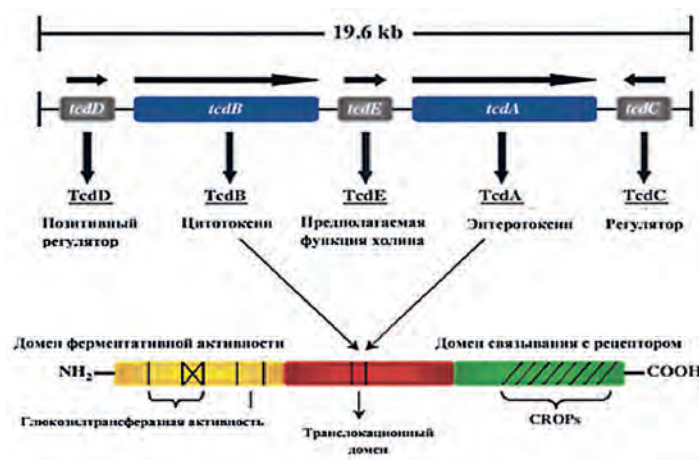


Рис. 4. Структура токсинов *C. difficile* [37].

модействует с белками-мишенями цитоплазмы, инактивируя их активность. В основе повреждающего действия токсинов TcdA и TcdB лежит способность их, за счет гликозилирования, инактивировать так называемые Rho-белки клеток человека. Rho-белки представляют собой группу низкомолекулярных ГТФ-связывающих белков, играющих важную роль в качестве регуляторов биологических процессов, обеспечивающих функционирование актинового цитоскелета; кроме того, они участвуют в пролиферации, формообразовании и поляризации энтероцитов, в регулировании барьерных функций эпителиальных клеток толстого кишечника, фагоцитозе и продукции супероксид-анионов [30]. Инактивация А- и В-токсинами Rho-белков объясняет широкий спектр повреждений эпителиальных клеток кишечника, отмечаемый у пациентов при КДИ.

Существует два механизма участия гликозилирующих А- и В-токсинов *C. difficile* в патогенезе инфекций. Первый механизм связан с повреждением межклеточных контактов энтероцитов, которое приводит к повышенной эпителиальной проницаемости, что клинически проявляется диареей. При этом процессы восстановления проницаемости эпителия и клеточная пролиферация энтероцитов ингибируются, поскольку гликозилированные Rho-белки, упомянутые выше, не выполняют свои функции, что приводит к гибели эпителиальных клеток путем апоптоза. Вторым механизмом участия токсинов А и В – это прямая активация инфламмосомы нейтрофилов (белковый комплекс в нейтрофилах, который запускает воспалительную реакцию при контакте клетки с бактериями и играет важную роль в системе врожденного иммунитета) гликозилированными Rho-белками, что приводит к повышенному синтезу провоспалительных цитокинов интерлейкина-8 и интерферона- γ и, как следствие, к воспалению и поражению слизистой оболочки толстой кишки [31].

Молекулярные механизмы токсического действия TcdA и TcdB практически не отличаются. Однако в опытах на культурах клеток токсичность TcdB оказывается в 100–1000 раз сильнее токсина TcdA. Поэтому TcdA предложено было назвать энтеротоксином, а TcdB – цитотоксином [29]. В опытах с изогенными штаммами *C. difficile* было показано, что штамм, продуцирующий только токсин TcdB, способен также, как и дикий штамм, продуцирующий оба токсина, вызывать заболевание и гибель хомяков. Изогенный штамм, продуцирующий только токсин TcdA, тоже вызывал у зараженных хомяков колит, однако летальность среди них была существенно ниже, чем у хомяков, зараженных штаммом, продуцирующим токсин TcdB. В этих опытах было продемонстрировано также синергидное действие токсинов А и В. Следовательно, оба токсина являются важными факторами патогенеза КДИ, однако токсин TcdB, по всей вероятности, связан с более тяжелым течением инфекции [38].

Бинарный токсин *C. difficile* CDT, как указывалось выше, продуцируется клиническими штаммами реже, чем токсины TcdA и TcdB: по разным данным, его продуцируют 5–30% штаммов. Считается, что синтез бинарного токсина CDT указывает на высокую вирулентность штамма. Особенность данного токсина заключается в том, что он продуцируется не в виде одной белковой цепи, как TcdA или TcdB, а в виде двух отдельных олигопептидов – компонентов А (CDT-A) и В

(CDT-B), посттрансляционно объединяющихся в одну молекулу. Компонент CDT-B с молекулярной массой 100 kDa взаимодействует с рецептором энтероцитов толстой кишки – липолиз-стимулируемым липопротеиновым рецептором (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor/LSR) – и способствует проникновению CDT-A в цитоплазму энтероцита путем рецептор-зависимого эндоцитоза. CDT-A с молекулярной массой 50 kDa является АДФ-рибозилтрансферазой, которая способна расщеплять молекулу внутриклеточного НАД на никотинамид и аденозиндифосфорибозу (АДФ-рибозу) и переносить радикал АДФ-рибозы на молекулы актина эпителиальной клетки толстого кишечника. В результате АДФ-рибозирования мономерного актина наступает полная деградация актинового скелета энтероцитов, завершающаяся их гибелью (рис. 5) [32].

Синтез TcdA и TcdB кодируется, соответственно, генами *tcdA* и *tcdB*, локализованными на хромосоме *C. difficile* в составе локуса патогенности PaLoc размером 19,6 т.п.н. Помимо генов *tcdA* и *tcdB* на этом локусе расположены гены *tcdR*, *tcdE* и *tcdC*, участвующие в регуляции синтеза обоих токсинов. Клинические штаммы *C. difficile*, как правило, в составе локуса PaLoc несут оба гена токсигенности – *tcdA* и *tcdB*, такие штаммы принято обозначать как А⁺В⁺. В случае, если в штамме детектируется один из генов *tcdA* или *tcdB*, штаммы обозначают как А⁺В⁻ или А⁻В⁺ соответственно. У непатогенных *C. difficile* локус PaLoc отсутствует и гены токсинов не детектируются, такие штаммы обозначают как А⁻В⁻. В работе Brouwer et al. показано, что локус PaLoc может передаваться, по крайней мере *in vitro*, от токсигенных к нетоксигенным штаммам *C. difficile*, то есть локус патогенности PaLoc ведет себя как мобильный генетический элемент [40]. Поэтому нельзя исключить его участие в формировании токсигенных штаммов *C. difficile* и в их эпидемическом распространении [41–43].

Изучение генов *tcdA* и *tcdB* у разных штаммов *C. difficile* позволило установить различия в их нуклеотидных последовательностях, которые могут быть вызваны либо точечными мутациями, либо делециями или инсерциями. Структурные различия генов *tcdA* и *tcdB*, детектируемые в разных штам-

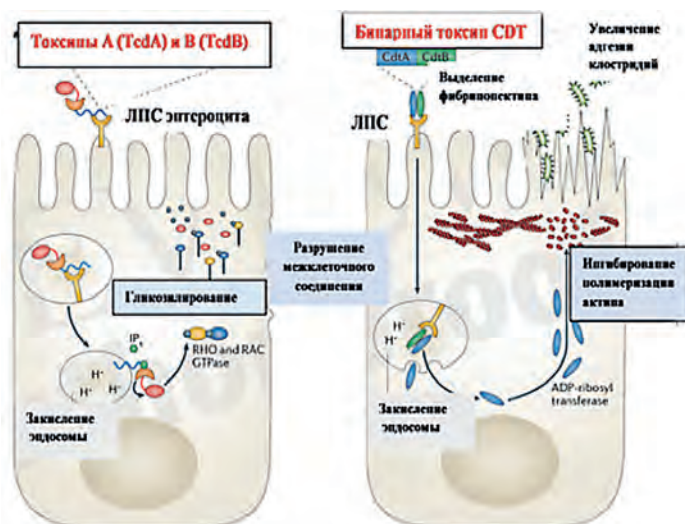


Рис. 5. Механизм действия токсинов А, В и бинарного CDT *C. difficile* [39].

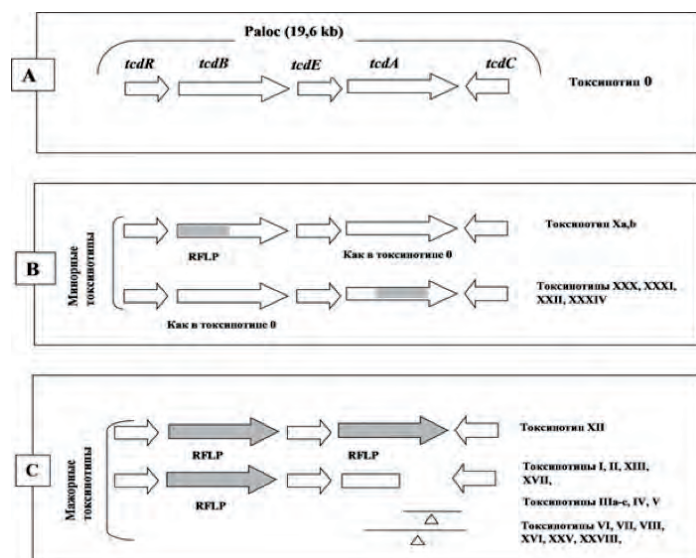


Рис. 6. Геномная организация локуса PaLoc *C. difficile*: А – PaLoc 0-токсинотипа; В – минорные токсинотипы; С – основные токсинотипы [46].

мах, послужили основой для разработки схемы токсинотипирования штаммов *C. difficile*. Для этой цели используют метод RFLP – определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов нуклеотидных последовательностей генов *tcdA* и *tcdB*, наработанных в полимеразной цепной реакции. Исходя из разнообразия полиморфизма длин рестрикционных фрагментов *tcdA* и *tcdB*, штаммам присваивают номер токсинотипа (от 0 до 34). За нулевой токсинотип (0-токсинотип) принимают токсинообразующий (A⁺B⁺) эталонный штамм *C. difficile* VPI10463, гены которого *tcdA* и *tcdB* не содержат мутаций. Штаммы *C. difficile*, аналогичные по токсинотипу с эталонным штаммом VPI10463, определяются как «невариантные» штаммы 0-токсинотипа. Все остальные штаммы *C. difficile* с измененными генами *tcdA* и *tcdB* обозначаются как варианты. Вариантные номера токсинотипов обозначаются римскими цифрами; на сегодня известны 34 токсинотипа *C. difficile* (I–XXXIV) (рис. 6) [44, 45].

Гипервирулентные штаммы

Благодаря систематическому изучению принадлежности клинических штаммов *C. difficile*, выделяемых во многих странах, к определенным токсинотипам и риботипам исследователям удалось выявить среди них особую группу так называемых гипервирулентных штаммов патогена [47]. Было установлено, что штаммы этой группы, как правило, принадлежат к III токсинотипу и относятся к небольшому числу риботипов, таких как 027, 034, 075, 080 и 078. Гипервирулентные штаммы, в отличие от «обычных» негипервирулентных, имеют ряд характерных свойств: все они, помимо токсинов А и В, продуцируют бинарный CDT-токсин; имеют более короткий временной период начала споруляции, благодаря чему количество спор гипервирулентных штаммов всегда превалирует над количеством спор негипервирулентных; гипервирулентные штаммы в большем количестве и с более высокой скоростью вырабатывают токсины [48]. Повышенная инфекционность гипервирулентных штаммов *C. difficile* была продемонстрирована в опытах

на животных. Orozco-Aguilar et al. показали, что негипервирулентный штамм *C. difficile*, которым была заражена большая часть экспериментальных мышей, постепенно был вытеснен и заменен гипервирулентным штаммом, носителем которого в группе были лишь единичные особи [49].

Одним из наиболее «успешных» и широко распространенных по всему миру гипервирулентных штаммов *C. difficile* стали штаммы риботипа 027. Впервые штаммы этого риботипа были выделены в Канаде в 2007 г. В последующие 15 лет риботип 027 распространился по всему миру; для США штаммы этого риботипа стали эндемичными [50, 51]. Штаммы риботипа 027 образуют все три типа токсинов: TcdA, TcdB и бинарный токсин CDT, причем токсины TcdA и TcdB они продуцируют в большем количестве, нежели «обычные» негипервирулентные штаммы *C. difficile*. Повышенная продукция токсинов штаммами риботипа 027, как показали исследования, связана с мутацией в гене-регуляторе *tcdC* [52]. Штаммы риботипа 027 обычно ассоциируются с тяжелыми случаями КДИ, высокой частотой рецидивов болезни и повышенным уровнем смертности [53]. Другим примером гипервирулентных штаммов являются штаммы риботипа 078, часто встречающиеся в странах Европы. Штаммы этого риботипа демонстрируют такую же гиперпродукцию токсинов, как и штаммы риботипа 027 [54].

Адгезия и биопленкообразование

Помимо токсинов, играющих ведущую роль в патогенезе КДИ, большое внимание уделяется исследователями вопросам адгезии и формированию патогеном поверхностно-ассоциированных микробных сообществ – биопленок. Изучение этих процессов весьма актуально, в том числе и для выяснения причин рецидивов болезни, нередко случающихся у переболевших КДИ. В последние годы важная роль в адгезии и колонизации *C. difficile* установлена для таких клеточных компонентов, как фибронектин-связывающий белок А, высоко- и низкомолекулярные белки S-слоя (SLP-белки), а также белки клеточной стенки Cwp86 и Cwp84, хотя молекулярные механизмы адгезии и колонизации *C. difficile* пока окончательно не установлены [33]. *C. difficile*, как и многие другие возбудители хронических рецидивирующих инфекций, таких как кариес, пародонтит, инфекции мочевыводящих путей и легких, болезнь Крона и др., способны образовывать на слизистой кишечника биопленки, состоящие из клеток патогена, погруженных во внеклеточные полимерные субстанции (матрикс), состоящие в основном из белков, ДНК и полисахаридов. Об участии этих клеточных компонентов в образовании биопленок свидетельствуют эксперименты, в которых было продемонстрировано, что обработка культуры *C. difficile* протеиназой К и ДНКазой I приводит к ингибированию образования и деградации уже сформированных биопленок. С помощью окрашивания биопленок антителами против поверхностного полисахарида PS-II *C. difficile* доказано его присутствие в матриксе биопленки [34].

Активное участие в формировании биопленок принимает цистеиновая протеаза Cwp84, отвечающая за образование S-слоя у клеток *C. difficile*. Показано, что изогенный штамм *C. difficile* с дефектным геном *cwp84* имеет такую же скорость роста в бульоне, как и дикий (родительский) штамм,

однако этот мутант не способен формировать биопленки [35]. Полученные результаты указывают на прямое участие S-слоя и входящих в него Сwr-белков в формировании биопленки. Предполагается также, что на поздней стадии формирования биопленок принимают участие жгутики *C. difficile* [55]. Важная роль в образовании биопленки клетками *C. difficile* принадлежит также одному из основных модуляторов кворум-сенсинга – аутоиндуктору AI-2. Показано, что мутант по гену *luxS*, кодирующему синтез AI-2, не способен образовывать биопленок, что позволяет предположить, что система кворум-сенсинга, опосредованная геном *luxS*, важна для образования биопленок [56].

Процесс споруляции у *C. difficile* также тесно связан с биопленкообразованием. Показано, что мутанты по гену, аналогу гена *SpoOA*, гену-регулятору споруляции, не способны образовывать биопленок; у таких мутантов были существенно снижены адгезивные свойства, из чего следует, что фактор *SpoOA*, скорее всего, принимает участие на ранней стадии формирования биопленок. Здесь же следует заметить, что фактор *SpoOA* связан также и с продукцией токсинов клетками *C. difficile*, хотя эта связь до сих пор в полной мере не ясна. Предполагается, что регулон *SpoOA* способен действовать как генетический переключатель, запуская, в зависимости от стрессовой ситуации, в которой находится патоген, либо процесс споруляции, либо пленкообразования, или образование токсинов. Например, при недостатке питательных веществ фактор *SpoOA* индуцирует образование спор, которые могут стать основной частью зрелой биопленки [34]. На рис. 7 представлена гипотетическая модель развития биопленки у *C. difficile*.

Формирование патогенами биопленок обеспечивает им защиту и выживание в неблагоприятных условиях среды обитания, например защиту от антибиотиков, кислородного стресса, ксенобиотиков и других вредных факторов. Важно отметить, что биопленки обеспечивают защиту клеток патогена от губительного действия иммунной системы макроорганизма [34]. Устойчивость к антибиотикам бактерий, находящихся в биопленках, например *Staphylococcus aureus*, может возрастать от 10 до 100 раз по сравнению с планктонными формами того же микроба. В то же время нужно иметь в виду, что субингибирующие концентрации антибиотиков стимулируют образование биопленок, как это было показано для *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [58]. Клетки

C. difficile, защищенные матриксом биопленки, также были более устойчивы к высоким концентрациям ванкомицина (20 мг/л), нежели планктонные формы патогена. Субингибирующие и ингибирующие концентрации ванкомицина (0,25 и 0,5 мг/л) стимулировали формирование биопленок [59]. Таким образом, два генетически детерминированных видовых признака *C. difficile*, споруляция и биопленкообразование, обеспечивают патогену повышенную выживаемость и длительное персистирование в организме человека. Оба эти признака с большой вероятностью имеют отношение к случаям рецидивов инфекции у людей, первично переболевших КДИ.

Геном *C. difficile*

Биоинформатический анализ полногеномных сиквенсов штаммов *C. difficile* свидетельствует о пластичности и мозаичности их геномов. Величина генома патогена составляет $4,3 \times 10^6$ п.н., содержание ГЦ оснований составляет 26–28%. Геном *C. difficile* существенно больше (на 42%), чем геномы близкородственных клостридиальных видов, *C. bifermentans* и *C. fricklandii*, и больше, чем у многих видов бактерий группы *Firmicutes* [60].

У *C. difficile* значительную долю генома (11%) занимают мобильные генетические элементы (МГЭ), среди которых идентифицированы плазмиды, профаги, геномные острова, транспозоны (Tn), инсерционные последовательности (IS), интерферирующие элементы *sigK*, интегроны, а также CRISPR-Cas-элементы [61].

Большинство свойств *C. difficile* ассоциированы с хромосомными генами, которые определяют химический состав, структуру и организацию клетки, ее метаболизм, пролиферацию и адаптацию патогена к месту обитания; они контролируют процессы споруляции, прорастания спор, адгезию патогена, образование им биопленки и другие внутриклеточные события, которые и обеспечивают популяции выживание и персистирование в микробиоме кишечника человека и животных, во внешней среде. Мобильные генетические элементы также играют важную роль в жизни *C. difficile*, во многом определяя изменчивость и эволюцию патогена, его устойчивость к стрессовым факторам. МГЭ *C. difficile* нередко являются носителями генов устойчивости к антимикробным препаратам, существенно затрудняющим лечение КДИ.

Изменения в геноме *C. difficile* могут происходить либо за счет перемещения (транспозиции) МГЭ, например IS- или Tn-элементов, из одного места хромосомы в другое, либо путем передачи МГЭ, например плазмид, из одной клетки *C. difficile* в другую. Следствием таких структурных изменений в геноме может стать появление новых свойств либо, напротив, утрата каких-либо признаков клеткой. В случае, если новые признаки окажутся полезными для клетки, они могут наследоваться в последующих поколениях.

Плазмиды *C. difficile*

Плазмидные ДНК сравнительно часто встречаются в клетках *C. difficile*. По разным данным, в 13–36% изолятов детектируют хотя бы одну плазмиду; некоторые штаммы могут иметь сразу несколько (4–6) плазмид [61–64]. У 5% изолятов *C. difficile*, выделяемых от человека и животных, обнаруживают криптические плазмиды [60]. Плазмиды

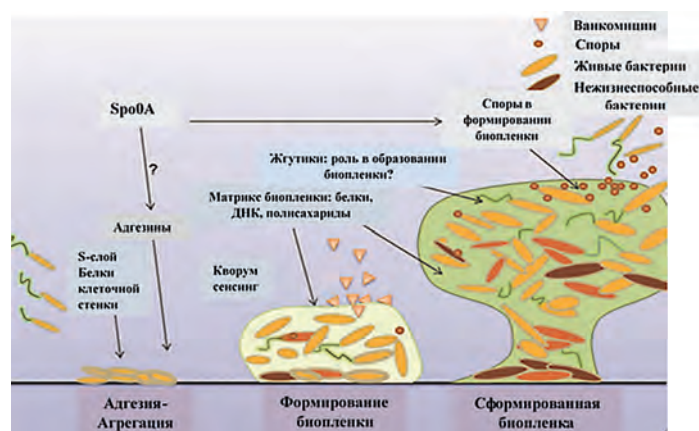


Рис. 7. Модель развития биопленки *C. difficile* [57].

C. difficile весьма гетерогенны, различаются между собой величиной, структурой, генетическими маркерами, способностью к передаче, принадлежностью к семейству, к группе несовместимости и другими свойствами [61]. Молекулярная масса плазмид *C. difficile*, как правило, не превышает 50 kb, большие плазмиды (100 Kb и более) встречаются редко. Подавляющее большинство плазмид *C. difficile* неконъюгативные, однако часть неконъюгативных плазмид, за счет мобилизации другими плазмидами, способна передаваться, другая часть – не мобилизуется и не передается. Конъюгативные плазмиды у *C. difficile* детектируют редко. Различаются плазмиды по степени распространения: наиболее часто у *C. difficile* встречаются плазмиды семейств CD-3, CD-6 и CD-630. Особенностью плазмид *C. difficile* является их высокая специфичность: они редко встречаются у бактерий других клостридиальных видов [65].

Плазмиды *C. difficile*, как и плазмиды других видов микроорганизмов, нередко являются носителями детерминант устойчивости к антимикробным препаратам. У *C. difficile* обнаружена плазида pCD-METRO, кодирующая устойчивость микроба к метронидазолу, препарату, используемому при лечении КДИ [60]. Описана плазида с геном *cfrC* метилтрансферазы 23SpPHK, придающая устойчивость патогену к монолидиду, активному в отношении многих грамположительных бактерий, включая *Clostridium* spp., и к фениколу, активному против грамотрицательных бактерий [66]. Детектированы также плазмиды, ассоциированные с толерантностью и устойчивостью *C. difficile* одновременно к метронидазолу и ванкомицину [61].

Как известно, гены, детерминирующие синтез главных токсинов *C. difficile*, TcdA, TcdB и бинарного токсина CDT, обычно локализованы на хромосоме в составе острова патогенности PaLoc. Однако в 2018 г. при анализе нуклеотидных последовательностей геномов *C. difficile* была обнаружена большая (145 kb) плазида pHSJD-312 с генами монотоксина TcdB и бинарного токсина CDT; на плазмиде также были локализованы гены системы четвертого типа секреции (T4SS). Важно заметить, что плазмидно-кодируемый белок токсина TcdB по аминокислотному составу во многом идентичен токсину TcdB эпидемического штамма *C. difficile* риботипа 027, но имеет различия в своем гликозилтрансферазном домене. Плазида pHSJD-312 на сегодняшний день является единственной конъюгативной плазмидой, обнаруженной у *C. difficile*, которую можно считать плазмидой вирулентности возбудителя псевдомембранозного колита. Благодаря своей конъюгативности плазида pHSJD-312, по всей вероятности, способна участвовать в формировании новых токсигенных штаммов *C. difficile*. В заключение следует отметить, что ареал распространения и природные резервуары плазмид *C. difficile* неизвестны [67].

Транспозоны *C. difficile*

У *C. difficile* различают два типа транспозонов: конъюгативные (CTns) и мобилизуемые (MTns). CTns, называемые также интегративными конъюгативными элементами (ICE), являются генетическими локусами, способными переносить себя из клетки-донора в клетку-реципиент с помощью механизма, подобного конъюгации. В отличие от плазмид, Tn-элементы обычно не содержат кодонов начала репликации,

поэтому для выживания они должны быть интегрированы в репликон хозяйской клетки. Мобилизуемые транспозоны MTns также могут передаваться по механизму, подобному конъюгации, но поскольку эти элементы не имеют генов, кодирующих этот процесс, они используют для этого гены конъюгативных транспозонов CTns или конъюгативных плазмид, присутствующих в этой же клетке. Биоинформатический анализ геномов *C. difficile* показал, что в их геномах присутствует множество предполагаемых CTns- и MTns-элементов, часть из которых способны к конъюгативному переносу. Tn-элементы, помимо генов, обеспечивающих их интеграцию в геном, эксцизию или конъюгацию, могут содержать также гены, способствующие выживанию *C. difficile* в экстремальных условиях среды обитания [68]. Несмотря на значительное количество Tn-элементов, обнаруживаемых в штаммах *C. difficile*, подробно исследованы лишь некоторые из них. Наиболее изученным является конъюгативный транспозон Tn5397, способный передаваться между штаммами *C. difficile*, а также между клетками *C. difficile*, *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecalis*. Транспозон Tn5397 имеет размер 21 kb, может встраиваться только в строго определенные локусы хромосомы *C. difficile*. Этот транспозон является носителем генов устойчивости к тетрациклину [69].

В клетках *C. difficile* детектирован также транспозон Tn916, весьма схожий по своим свойствам с транспозоном Tn5397, он так же несет гены резистентности к тетрациклину, однако, в отличие от Tn5397, может встраиваться во множество сайтов хромосомы *C. difficile*. По этой причине Tn916 используют в качестве инструмента в генетических исследованиях *C. difficile* для получения мутантов и клонирования генов патогена [70].

В штамме *C. difficile* W1 идентифицированы транспозоны Tn4453a и Tn4453b, которые придают штамму устойчивость к хлорамфениколу [71]. Эти транспозоны генетически близки к мобилизуемому транспозону Tn4451 *C. perfringens*. Описан транспозон Tn5398, который придает штаммам *C. difficile* устойчивость одновременно к макролидам, линкомицину и стрептограмину. Этот транспозон способен передаваться между штаммами *C. difficile*, а также от *C. difficile* к представителям гетерологичных видов – *B. subtilis* и *S. aureus* [72].

Клетки *C. difficile* содержат также мобильный генетический элемент *skin Cd*, идентифицированный как профагоподобная последовательность, интегрированная в ген *sigK*. Вырезание этого элемента из гена *sigK* спорулирующей материнской клетки приводит к выработке сигма-фактора K, необходимого для каскада споруляции [73].

Бактериофаги *C. difficile*

Штаммы *C. difficile* в своих геномах могут содержать гены умеренных (лизогенных) бактериофагов. Показано, что профаги фCD119, фCD27 и фCD38-2 способны повышать или понижать выработку клетками *C. difficile* токсинов путем прямого связывания с регуляторным геном *tcdR* в локусе PaLoc [74]. V.Kreis et al. продемонстрировали передачу с помощью трансдуцирующего бактериофага FC2 гена устойчивости к тетрациклину, находящегося в составе конъюгативного транспозона, из одного штамма *C. difficile* в другой. Это был первый эксперимент, продемонстрировавший возмож-

ность распространения генов антибиотикорезистентности среди *C. difficile* с помощью бактериофага [75]. Нельзя исключить возможность переноса фагами и других генов, в том числе генов токсинообразования.

Геномные острова *C. difficile*

Особый интерес представляют данные, свидетельствующие о возможном переносе между штаммами *C. difficile* геномного острова PaLoc, на котором локализованы гены токсинов TcdA и TcdB. PaLoc, по мнению исследователей, обладает свойствами мобильного генетического элемента, поскольку постоянно располагается на одном и том же месте хромосомы токсигенных штаммов *C. difficile*, а в нетоксигенных штаммах место локализации PaLoc занимает некодирующая последовательность (115 п.н.). Показано, что PaLoc переносится, как правило, совместно с конъюгативными транспозонами CTns: в трансконъюгатах, содержащих PaLoc, почти всегда присутствует неселектируемый CTn, что указывает на связь переноса PaLoc и CTn [76]. Важно отметить, что вновь приобретенные с помощью переноса PaLoc гены токсинов экспрессировались в ранее нетоксигенном штамме *C. difficile* CD37 [40]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности превращения нетоксигенного штамма *C. difficile* в токсигенный. Этот факт необходимо учитывать при реализации предложений клиницистов по использованию нетоксигенных штаммов *C. difficile* в терапии КДИ. В этой связи весьма необходимы исследования по изучению молекулярных механизмов, обуславливающих передачу острова PaLoc среди *C. difficile*.

Приведенные выше краткие сведения о мобильных генетических элементах свидетельствуют об их влиянии на пластичность генома и на биологические свойства *C. difficile*. Внутригеномные перестройки, вызываемые МГЭ, их влияние на обмен генетической информацией между клетками *C. difficile*, по всей вероятности, являются одним из факторов изменчивости и эволюции возбудителя КДИ, а также адаптации его к условиям пребывания.

Устойчивость к антимикробным препаратам

Распространение КДИ среди людей и животных тесно связано с широким использованием антибиотиков и других химиопрепаратов в клинической практике медицины и ветеринарии. Поэтому не удивительно, что выделяемые от больных пациентов и животных штаммы *C. difficile* часто оказываются устойчивыми к антимикробным препаратам (АМП). Особенно острой проблема антибиотикорезистентности *C. difficile* стала после появления устойчивых к АМП гипервирулентных штаммов эпидемических риботипов, таких как риботип 027, возникновение и распространение которого ассоциируют с чрезмерным использованием в медицине препаратов группы фторхинолонов [77]. Результаты исследований антибиотикорезистентности *C. difficile* показывают, что наиболее часто клинические штаммы устойчивы к ципрофлоксацину, эритромицину и цефалоспорином 2-го поколения (цефуроксиму, цефаклору и др.). Менее устойчивы *C. difficile* к цефалоспорином 3-го поколения (цефотаксиму, цефтриаксону, цефтазидиму и др.) и фторхинолонам 4-го поколения (моксифлоксацину) [78]. Доля устойчивых штаммов *C. difficile* к тетрациклину варьирует в разных странах от

2 до 42% [79]. Brajerovaa et al. проанализировали устойчивость *C. difficile* различных риботипов к метронидазолу, моксифлоксацину и рифампину. Они установили, что спектр резистентности *C. difficile* зависел не только от принадлежности штамма к риботипу, но и от региона его выделения: риботипы, циркулирующие, например, в Европе, имели спектр устойчивости к антимикробным препаратам другой, нежели риботипы *C. difficile*, изолированные в регионе Дальнего Востока [80].

У клинических штаммов *C. difficile* детектирован ряд генов, предположительно β-лактамаз, обуславливающих устойчивость их к β-лактамам антибиотикам [81]. Описаны также гены, кодирующие рибосомальные метилазы, обеспечивающие устойчивость *C. difficile* к макролидам, в частности к эритромицину; авторы работы отмечали широкое распространение этой группы генов среди *C. difficile* [81–83]. На хромосоме *C. difficile* выявлена область мутации QRDR, которая ассоциируется с устойчивостью штаммов к фторхинолонам [82]. Heidari et al. сообщили, что устойчивость *C. difficile* к тетрациклину может быть обусловлена не только геном *tetM*, но и геном *tetW*, встречающимся в штаммах человека и животных [83]. Freeman et al. показали, что устойчивость к хлорамфениколу у *C. difficile* связана с присутствием у них гена *cstD*, который кодирует хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, этот ген может быть локализован на транспозоне [84].

Патогенез заболевания

КДИ начинается после попадания возбудителя из внешней среды в желудок человека или животного. Большинство вегетативных клеток, как показывают экспериментальные данные, в кислой среде желудка погибают [85]. Однако споры *C. difficile*, благодаря устойчивости к кислой среде, проходят через него и адгезируются в тонком кишечнике. Здесь, в благоприятных для них условиях и при сниженной конкуренции со стороны нормальной кишечной микробиоты, споры *C. difficile* при воздействии желчных кислот, в частности таурохолевой кислоты, быстро прорастают и, в виде вегетативных клеток, мигрируют в толстую кишку, наиболее частое место локализации инфекционного процесса (рис. 8А).

Попав в толстый кишечник, *C. difficile* экспрессирует ряд факторов вирулентности: жгутики и фимбрии, способствующие движению и прикреплению бактерий к слизистой кишечника; протеолитические и гидролитические ферменты, нарушающие слизистый барьер кишечника; белки клеточной стенки Cwp66, способствующие адгезии *C. difficile* к энтероцитам; антифагоцитарная капсула (S-слой), препятствующая опсонизации и поглощению патогена полиморфными лейкоцитами. Как только *C. difficile* локализуется на слизистой толстой кишки, бактерии начинают продуцировать токсины CdtA, CdtB и, в ряде случаев, бинарный CDT-токсин. Показано, что токсин CdtA (энтеротоксин) вызывает воспаление слизистой толстой кишки и индуцирует секрецию жидкости в кишечнике. Именно с токсическим действием CdtA связывают развитие водянистой диареи у больных КДИ. Токсин CdtB (цитотоксин) является основной причиной гибели эпителиальных клеток кишечника. В то же время повышенная продукция этого токсина может привести к пора-

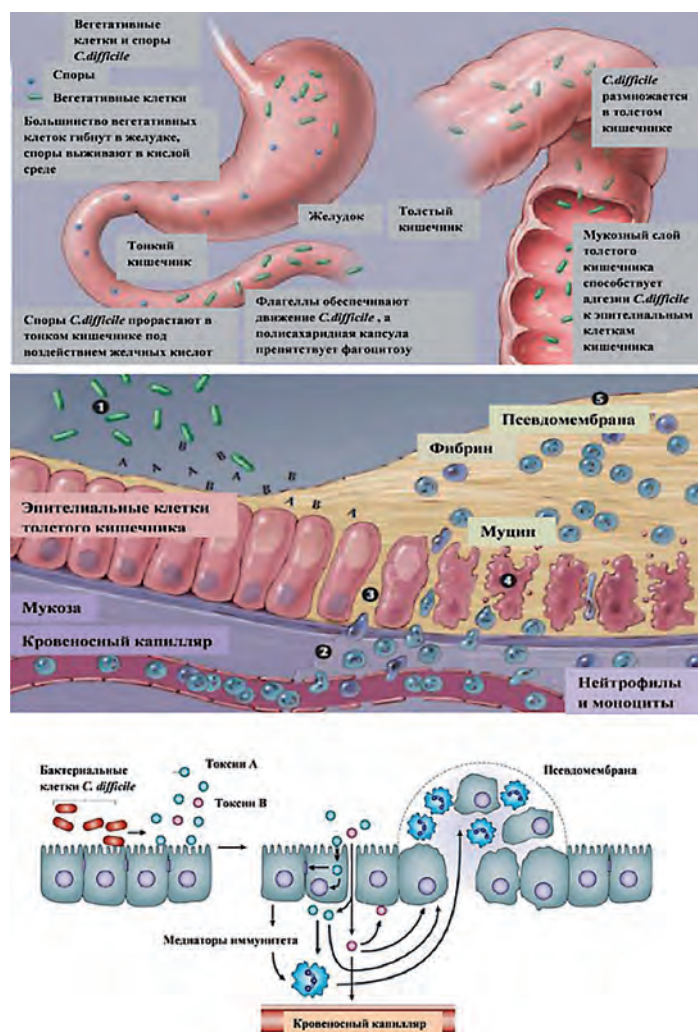


Рис. 8. Колонизация *C. difficile* толстого кишечника и патогенез заболевания: А – прорастание спор и адгезия; Б, Г – токсинообразование и ответ иммунной системы. Адаптировано из [88].

жению других (кроме кишечника) органов и систем, например сердечно-сосудистой. Основная мишень бинарного токсина CDT – актиновые волокна эукариотических клеток, включая энтероциты и фагоцитирующие клетки. Вследствие деградации актинового скелета клеток они либо погибают, либо теряют свои функции (например, макрофаги под действием CDT теряют свою фагоцитирующую способность). Другой механизм патогенетического действия CDT связан с его прямым влиянием на процессы иммунного ответа эукариотических клеток: CDT приводит к стимуляции воспалительной реакции, опосредованной Toll-like рецептором 2, вследствие снижения количества эозинофилов, обуславливающих контроль за процессами воспаления [86].

Патофизиологические и патоморфологические нарушения, вызванные токсинами *C. difficile*, усугубляются влиянием их на активность иммунной системы макроорганизма. В частности, токсины CdtA и CdtB индуцируют выработку резидентными макрофагами и моноцитами цитокинов: фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкинов IL-1 и IL-6. Будучи провоспалительными цитокинами, TNF- α , IL-1, IL-6 вызывают интенсивную миграцию нейтрофилов к месту локализации патогена. Миграции нейтрофилов к месту воспа-

ления способствует и IL-8, вырабатываемый макрофагами под действием токсинов *C. difficile*. Нейтрофильная инфильтрация слизистой является отличительной особенностью энтероколита, вызываемого *C. difficile* (рис. 8Б, 8Г).

Инфильтрация слизистой нейтрофилами способствует повышенной ее проницаемости и нарушению целостности межклеточных соединений, что приводит к разрушению цитоскелетных структур (актина) в энтероцитах. В тяжелых случаях течения болезни на внешней поверхности слизистой толстой кишки возникают псевдомембраны, состоящие из гнойного фибринозного экссудата и иммунных клеток [87].

Заключение

Биологические особенности *C. difficile*, возбудителя антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита, такие как наличие S-слоя, способность к образованию спор и формированию биопленок, позволяют патогену длительно персистировать в организме человека и сохраняться в неблагоприятных условиях внешней среды. Эти свойства представляют потенциальную опасность для иммунокомпрометированных лиц и лиц, находящихся на стационарном лечении и подвергающихся (или подвергавшихся ранее) интенсивной антибиотикотерапии.

Основными факторами вирулентности *C. difficile* являются TcdA, TcdB и бинарный CDT-токсин, вызывающие поражение толстого кишечника и развитие тяжелых форм диареи и псевдомембранозного колита. Особую опасность для человека представляет группа гипервирулентных эпидемически успешных штаммов *C. difficile* риботипов 027, 078, 075 и др., синтезирующих повышенные количества всех трех токсинов и вызывающих особо тяжелые формы КДИ.

В геноме *C. difficile* может присутствовать большое количество мобильных генетических элементов (плазмиды, бактериофаги, транспозоны и др.), способствующих обмену генетической информацией между *C. difficile* и быстрой адаптации патогена к условиям его обитания.

Среди штаммов *C. difficile*, возбудителей КДИ, часто детектируют устойчивые к антибиотикам варианты патогена, в том числе устойчивых к β -лактамам, фторхинолонам, макролидам, тетрациклинам, хлорфениколу и рифампицину. Встречаются штаммы, резистентные к ванкомицину и метронидазолу – препаратам, часто используемым для эффективного лечения КДИ. Распространение антибиотикорезистентности среди *C. difficile* нацеливает исследователей на поиски новых, альтернативных антибиотикам путей лечения КДИ.

Уникальные биологические особенности возбудителя КДИ, описанные в обзоре, свидетельствуют о весьма высоком патогенном его потенциале и о больших трудностях в организации противоэпидемических мероприятий против этой инфекции и ее лечении.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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

1. Czepiel J, Drózd M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, et al. *Clostridium difficile* infection: review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Jul;38(7):1211-1221. DOI: 10.1007/s10096-019-03539-6
2. Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child. 1935;49:390.
3. Johnson S, Laverne V, Skinner AM, Gonzales-Luna AJ, Garey KW, Kelly CP, Wilcox MH. Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update guidelines on management of *Clostridioides difficile* infection in adults. Clin Infect Dis. 2021;73:1029-1044.
4. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Ann Intern Med. 1974;81(4):429-433.
5. Pereira JA, McGeer A, Tomovici A, Selmani A, Chit A. Incidence and economic burden of *Clostridioides difficile* infection in Ontario: a retrospective population-based study. CMAJ Open. 2020 Jan 30;8(1):E16-E25. DOI: 10.9778/cmajo.20190018
6. Kurti Z, Lovasz BD, Mandel MD, Csima Z, Golovics PA, Csako BD, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2020: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe. World J Gastroenterol. 2020;21(21):6728-6735. DOI: 10.3748/wjg.v21.i21.6728
7. Алёшкин ВА, Селькова ЕП, Миронов АЮ, Гренкова ТА, Шелыгин ЮА, Сухина МА, Ачкасов СИ, Сафин АЛ. Лабораторная диагностика *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей. Федеральные клинические рекомендации. М., 2017, 24 с. / Aleshkin VA, Selkova EP, Mironov AYU, Grenkova TA, Shelygin YuA, Sukhina MA, Achkasov SI, Safin AL. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Federal clinical guidelines. Moscow, 2017, 24 p. (In Russian).
8. Николаева ИВ, Халлиулина СВ, Муртазина ГХ, Анохин ВА. Инфекция, вызванная *Clostridioides (Clostridium) difficile*. Обзор актуальных клинических рекомендаций. Практическая медицина. 2020;18(6):106-112. / Nikolaeva IV, Khaliullina SV, Murtazina GK, Anokhin VA. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. Review of current clinical guidelines. Practical Medicine. 2020;18(6):106-112. DOI: 10.32000/2072-1757-2020-6-106-112 (In Russian).
9. Kao D, Wong K, Franz R, Cochrane K, Sherriff K, Chui L, et al. The effect of a microbial ecosystem therapeutic (MET-2) on recurrent *Clostridioides difficile* infection: a phase 1, open-label, single-group trial. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2021 Apr;6(4):282-291. DOI: 10.1016/S2468-1253(21)00007-8
10. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes. 2012 Mar-Apr;3(2):121-34. DOI: 10.4161/gmic.19399
11. Davies AH, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR. Super toxins from a super bug: Structure and function of *Clostridium difficile* toxins. Biochem J. 2021;436(3):517-526.
12. Segal JP, Mullish BH, Quraishi MN, Iqbal T, Marchesi JR, Sokol H. Mechanisms underpinning the efficacy of faecal microbiota transplantation in treating gastrointestinal disease. Therap Adv Gastroenterol. 2020 Sep 3;13:1756284820946904. DOI: 10.1177/1756284820946904
13. Tam J, Icho S, Utama E, Orrell KE, Gómez-Biagi RF, Theriot CM, et al. Intestinal bile acids directly modulate the structure and function of *C. difficile* TcdB toxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(12):6792-6800.
14. Barbut F, Gariazzo B, Bonne L, Lalande V, Burghoffer B, Luiuz R, Petit JC. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization strains: results of a retrospective study, 2000-2004. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007 Feb;28(2):131-9. DOI: 10.1086/511794
15. Nobuaki M, Takashi T. Characteristics and Immunological Roles of Surface Layer Proteins in *Clostridium difficile*. Ann Lab Med. 2018 May;38(3):189-195. DOI: 10.3343/alm.2018.38.3.189
16. Krautkramer KA, Fan J, Backhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. Nat Rev Microbiol. 2021 Feb;19(2):77-94. DOI: 10.1038/s41579-020-0438-4
17. Tenover FC, Tickler IA, Persing DH. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jun;56(6):2929-32. DOI: 10.1128/AAC.00220-12
18. Guery B, Galperine T, Barbut F. *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments. BMJ. 2019 Aug 20;366:14609. DOI: 10.1136/bmj.14609
19. Zhu D, Wang S, Sun X. FliW and CsrA Govern Flagellin (FliC) Synthesis and Play Pleiotropic Roles in Virulence and Physiology of *Clostridioides difficile* R20291. Front Microbiol. 2021;12:1-14.
20. Gupta A, Saha S, Khanna S. Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future. World J Gastroenterol. 2020 Feb 28;26(8):777-788. DOI: 10.3748/wjg.v26.i8.777. PMID: 32148376
21. Kaus GM, Snyder LF, Müh U, Flores MJ, Popham DL, Ellermeier CD. Lysozyme Resistance in *Clostridioides difficile* Is Dependent on Two Peptidoglycan Deacetylases. J Bacteriol. 2020 Oct 22;202(22):e00421-20. DOI: 10.1128/JB.00421-20
22. Cox AD, Michael FSt, Aubry A, Strong PCR, Hayes AC, Logan SM. Comparison of polysaccharide glycoconjugates as candidate vaccines to combat *Clostridioides (Clostridium) difficile*. Glycoconjugate J. 2021;38:493-508.
23. Castro-Córdova P, Mora-Urbe P, Reyes-Ramírez R, Cofré-Araneda G, Orozco-Aguilar J, Brito-Silva C, et al. Entry of spores into intestinal epithelial cells contributes to recurrence of *Clostridioides difficile* infection. Nat Commun. 2021 Feb 18;12(1):1140. DOI: 10.1038/s41467-021-21355-5. Erratum in: Nat Commun. 2022 Apr 29;13(1):2465.
24. Martins D, DiCandia MA, Mendes AL, Wetzel D, McBride SM, Henriques AO, Serrano M. CD25890, a conserved protein that modulates sporulation initiation in *Clostridioides difficile*. Sci Rep. 2021;11:7887-7892.
25. Pizarro-Guajardo M, Calderón-Romero P, Romero-Rodríguez A, Paredes-Sabja D. Characterization of Exosporium Layer Variability of *Clostridioides difficile* Spores in the Epidemically Relevant Strain R20291. Front Microbiol. 2020 Jul 2;11:1345. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01345
26. Kochan TJ, Foley MH, Shoshiev MS, Somers MJ, Carlson PE, Hanna PC. Updates to *Clostridium difficile* Spore Germination. J Bacteriol. 2018 Jul 25;200(16):e00218-18. DOI: 10.1128/JB.00218-18. PMID: 29760211
27. Chilton CH, Pickering, Freeman J. Microbiological factors affecting *Clostridium difficile* recurrence. Clin Microbiol Infect. 2018;24:476-482.
28. Wexler AG, Guiberson ER, Beavers WN, Shupe JA, Washington MK, Lacy DB, et al. *Clostridioides difficile* infection induces a rapid influx of bile acids into the gut during colonization of the host. Cell Rep. 2021 Sep 7;36(10):109683. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109683
29. Henkel D, Tatge H, Schöttelndreier D, Tao L, Dong M, Gerhard R. Receptor Binding Domains of TcdB from *Clostridioides difficile* for Chondroitin Sulfate Proteoglycan-4 and Frizzled Proteins Are Functionally Independent and Additive. Toxins. 2020;12:736-752.
30. Schöttelndreier D, Langejürgen A, Lindner R, Genth H. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Is Involved in the Uptake of *Clostridioides difficile* Toxin A and Serves as an Internalizing Receptor. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Oct 19;10:565465. DOI: 10.3389/fcimb.2020.565465
31. Ruhe F, Olling A, Abromeit R, Rataj D, Grieschat M, Zeug A, et al. Overexpression of the Endosomal Anion/Proton Exchanger CIC-5 Increases Cell Susceptibility

- toward *Clostridium difficile* Toxins TcdA and TcdB. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:1-15.
32. Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun;17(6):976-82. DOI: 10.3201/eid1706.101483
 33. Normington C, Moura IB, Bryant JA, Ewin DJ, Clark EV, Kettle MJ, et al. Biofilms harbour *Clostridioides difficile*, serving as a reservoir for recurrent infection. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021 Feb 5;7(1):16. DOI: 10.1038/s41522-021-00184-w
 34. Dawson LF, Peltier J, Hall CL, Harrison MA, Derakhshan M, Shaw HA, et al. Extracellular DNA, Cell Surface Proteins and C-Di-GMP Promote Biofilm Formation in *Clostridioides Difficile*. *Sci Rep*. 2021;11:3244.
 35. Taggart MG, Snelling WJ, Naughton PJ, La Ragione RM, Dooley JSG, Ternan NG. Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: Novel systems linked to hypervirulence. *PLoS Pathog*. 2021 Sep 9;17(9):e1009817. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009817
 36. Orrell KE, Melnyk RA. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2021 Aug 18;85(3):e0006421. DOI: 10.1128/MMBR.00064-21
 37. Di Bella S, Ascenzi P, Siarakas S, Petrosillo N, di Masi A. *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins (Basel)*. 2016 May 3;8(5):134. DOI: 10.3390/toxins8050134
 38. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Nov 1;41(6):723-750. DOI: 10.1093/femsre/fux048
 39. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Oct;14(10):609-20. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.108
 40. Brouwer MSM, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun*. 2013;4:2601. DOI: 10.1038/ncomms3601.
 41. Saund K, Pirani A, Lacy DB, Hanna PC, Snitkin E. View ORCID ProfileEvan SnitkinStrain variation in *Clostridioides difficile* toxin activity associated with genomic variation at both PaLoc and non-PaLoc loci. *bioRxiv*. 2021;23:11-19.
 42. Ahn SW, Lee SH, Kim UJ, Jang HC, Choi HJ, Choy HE, et al. Genomic characterization of nine *Clostridioides difficile* strains isolated from Korean patients with *Clostridioides difficile* infection. *Gut Pathog*. 2021 Sep 16;13(1):55. DOI: 10.1186/s13099-021-00451-3
 43. Kodori M, Ghalavand Z, Yadegar A, Eslami G, Azimirad M, Krutova M, et al. Molecular characterization of pathogenicity locus (PaLoc) and *tcdC* genetic diversity among *tcdA+B+* *Clostridioides difficile* clinical isolates in Tehran, Iran. *Anaerobe*. 2020 Dec;66:102294. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102294
 44. Skinner AM, Phillips ST, Merrigan MM, O'Leary KJ, Sambol SP, Siddiqui F, et al. The Relative Role of Toxins A and B in the Virulence of *Clostridioides difficile*. *J Clin Med*. 2020 Dec 30;10(1):96. DOI: 10.3390/jcm10010096
 45. Aliramezani A, Talebi M, Baghani A, Hajabdolbaghi M, Salehi M, Abdollahi A, et al. Pathogenicity locus determinants and toxinotyping of *Clostridioides difficile* isolates recovered from Iranian patients. *New Microbe New Infect*. 2018;25:52-57.
 46. Cairns MD, Preston MD, Hall CL, Gerding DN, Hawkey PM, Kato H, et al. Comparative Genome Analysis and Global Phylogeny of the Toxin Variant *Clostridium difficile* PCR Ribotype 017 Reveals the Evolution of Two Independent Sublineages. *J Clin Microbiol*. 2017 Mar;55(3):865-876. DOI: 10.1128/JCM.01296-16. Epub 2016 Dec 28. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2017 Jun;55(6):1971.
 47. Shaw HA, Preston MD, Vendrik KEW, Cairns MD, Browne HP, Stabler RA, et al. The recent emergence of a highly related virulent *Clostridium difficile* clade with unique characteristics. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Apr;26(4):492-498. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.09.004
 48. Fatima R, Aziz M. The hypervirulent strain of *Clostridium difficile*: NAP1/B1/027: a brief overview. *Cureus*. 2019 Jan 29;11(1):e3977. DOI: 10.7759/cureus.3977
 49. Orozco-Aguilar J, Alfaro-Alarcón A, Acuña-Amador L, Chaves-Olarte E, Rodríguez C, Quesada-Gómez C. *In vivo* animal models confirm an increased virulence potential and pathogenicity of the NAP1/RT027/ST01 genotype within the *Clostridium difficile* MLST Clade 2. *Gut Pathog*. 2020;12:45-55.
 50. Endres BT, Begum K, Sun H, Walk ST, Memariani A, Lancaster C, et al. Epidemic *Clostridioides difficile* Ribotype 027 Lineages: Comparisons of Texas Versus Worldwide Strains. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Feb 9;6(2):ofz013. DOI: 10.1093/ofid/ofz013
 51. Imwattana K, Knight DR, Kullin B, Collins DA, Putsathit P, Kiratisin P, Riley TV. *Clostridium difficile* ribotype 017 – characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):796-807. DOI: 10.1080/22221751.2019.1621670
 52. Edwards AN, Krall EG, McBride SM. Strain-Dependent RstA Regulation of *Clostridioides difficile* Toxin Production and Sporulation. *J Bacteriol*. 2020;202:19-36.
 53. Kuenzli AB, Burri S, Casanova C, Sommerstein R, Buetti N, Seth-Smith HMB, et al. Successful management of a *Clostridioides difficile* ribotype 027 outbreak with a lean intervention bundle. *J Hosp Infect*. 2020 Oct;106(2):240-245. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.07.034
 54. Connor MC, McGrath JW, McMullan G, Marks N, Guelbenzu M, Fairley DJ. Emergence of a non-sporulating secondary phenotype in *Clostridium (Clostridioides) difficile* ribotype 078 isolated from humans and animals. *Sci Rep*. 2019 Sep 23;9(1):13722. DOI: 10.1038/s41598-019-50285-y
 55. Frost LR, Cheng JKJ, Unnikrishnan M. *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? *PLoS Pathog*. 2021 Mar 11;17(3):e1009348. doi: 10.1371/journal.ppat.1009348
 56. Slater RT, Frost LR, Jossi SE, Millard AD, Unnikrishnan M. *Clostridioides difficile* LuxS mediates inter-bacterial interactions within biofilms. *Sci Rep*. 2019 Jul 9;9(1):9903. DOI: 10.1038/s41598-019-46143-6
 57. Dapa T, Unnikrishnan M. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes*. 2013;4(5):397-402.
 58. Rahmoun LA, Azrad M, Peretz A. Antibiotic Resistance and Biofilm Production Capacity in *Clostridioides difficile*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Aug 4;11:683464. DOI: 10.3389/fcimb.2021.683464
 59. Khurana S, Kahl A, Dupont AW. Recent Advances in the Treatment of *Clostridioides Difficile* Infection: The Ever-Changing Guidelines. *Fac Rev*. 2020 Nov 18;9:13. DOI: 10.12703/b/9-13
 60. Boekhoud IM, Hornung BVH, Sevilla E, Harmanus C, Bos-Sanders IMJG, Terveer EM, et al. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nat Commun*. 2020 Jan 30;11(1):598. DOI: 10.1038/s41467-020-14382-1
 61. Pu M, Cho JM, Cunningham SA, Behera GK, Becker S, Amjad T, et al. Plasmid acquisition alters vancomycin susceptibility in *Clostridioides difficile*. *Gastroenterology*. 2021 Feb;160(3):941-945.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.10.046
 62. Bushman FD, Conrad M, Ren Y, Zhao C, Gu C, Petucci C, et al. Multi-omic analysis of the interaction between *Clostridioides difficile* infection and pediatric inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe*. 2020 Sep 9;28(3):422-433.e7. DOI: 10.1016/j.chom.2020.07.020
 63. Boekhoud IM, Sidorov I, Nooij S, Harmanus C, Bos-Sanders IMJG, Viprey V, et al; COMBACTE-CDI Consortium. Haem is crucial for medium-dependent metronidazole resistance in clinical isolates of *Clostridioides difficile*. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Jun 18;76(7):1731-1740. DOI: 10.1093/jac/dkab097
 64. Knight DR, Imwattana K, Kullin B, Guerrero-Araya E, Paredes-Sabja D, Didelot X, et al. Major genetic discontinuity and novel toxigenic species in *Clostridioides difficile* taxonomy. *Elife*. 2021 Jun 11;10:e64325. DOI: 10.7554/eLife.64325
 65. Ramirez-Vargas G, Rodriguez C. Putative conjugative plasmids with *tcdB* and *cdtAB* genes in *Clostridioides difficile*. *Emerg Infect Dis*. 2020 Sep;26(9):2287-2290. DOI: 10.3201/eid2609.191447
 66. Smits WK, Lyras D, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Apr 7;2:16020. DOI: 10.1038/nrdp.2016.20
 67. Ramirez-Vargas G, López-Ureña D, Badilla A, Orozco-Aguilar J, Murillo T, Rojas P, et al. *Clostridium difficile* strains escape diagnostic tests, differ in pathogenicity potential and carry toxins on extrachromosomal elements. *Sci Rep*. 2018 Sep 17;8(1):13951. DOI: 10.1038/s41598-018-32390-6

68. Kartalidis P, Skoulakis A, Tsilipounidaki K, Florou Z, Petinaki E, Fthenakis GC. *Clostridioides difficile* as a Dynamic Vehicle for the Dissemination of Antimicrobial-Resistance Determinants: Review and *In Silico* Analysis. *Microorganisms*. 2021;9(7):1383-1396.
69. Jasni AS, Mullany P and Roberts AP. Demonstration of Conjugative Transposon (Tn5397)-Mediated Horizontal Gene Transfer between *Clostridium difficile* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4924-4926.
70. Mullany P, Allan E, Roberts AP. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Res Microbiol*. 2015 May;166(4):361-7. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.005
71. Lyras D, Storie C, Huggins AS, Crellin PK, Bannam TL, Rood JI. Chloramphenicol Resistance in *Clostridium difficile* Is Encoded on Tn4453 Transposons That Are Closely Related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(7):1563-1570.
72. Farrow KA, Lyras D, Rood JI. Genomic analysis of the erythromycin resistance element Tn5398 from *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading)*. 2001 Oct;147(Pt 10):2717-2728. DOI: 10.1099/00221287-147-10-2717
73. Wu Y, Liu C, Li WG, Xu JL, Zhang WZ, Dai YF, Lu JX. Independent Microevolution Mediated by Mobile Genetic Elements of Individual *Clostridium difficile* Isolates from Clade 4 Revealed by Whole-Genome Sequencing. *mSystems*. 2019;4(2):e00252-18.
74. Whittle MJ, Bilverstone TW, van Esveld RJ, Lücke AC, Lister MM, Kuehne SA, Minton NP. A Novel Bacteriophage with Broad Host Range against *Clostridioides difficile* Ribotype 078 Supports StpA as the Likely Phage Receptor. *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e0229521. DOI: 10.1128/spectrum.02295-21
75. Kreis V, Soutourina O. *Clostridioides difficile* – phage relationship the RNA way. *Curr Opin Microbiol*. 2022 Apr;66:1-10. DOI: 10.1016/j.mib.2021.11.012
76. Van Eijk E, Anvar SY, Browne HP, Leung WY, Frank J, Schmitz AM, et al. Complete genome sequence of the *Clostridium difficile* laboratory strain 630 Δ erm reveals differences from strain 630, including translocation of the mobile element CTn5. *BMC Genomics*. 2015 Jan 31;16(1):31. DOI: 10.1186/s12864-015-1252-7
77. Yun JH, Park GE, Ki HK. Correlation between antibiotic consumption and the incidence of healthcare facility-onset *Clostridioides difficile* infection: a retrospective chart review and analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021 Aug 6;10(1):117. DOI: 10.1186/s13756-021-00986-9
78. Putsathit P, Maneerattanaporn M, Piewngam P Knight DR, Kiratisin P, Riley TV. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated in Thailand. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Jun 8;6:58. DOI: 10.1186/s13756-017-0214-z
79. Peng Z, Jin D, Sun X. Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*. 2017 Jul;55(7):1998-2008. DOI: 10.1128/JCM.02250-16
80. Brajerovaa M, Zikovaab J, Krutova M. *Clostridioides difficile* epidemiology in the Middle and the Far East. *Anaerobe*. 2022 Apr;74:102542. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2022.102542
81. Sandhu BK, Edwards AN and McBride SM. Regulation and Anaerobic Function of the *Clostridioides difficile* β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;64(1):1496-1515.
82. Mac Aogáin M, Kilkenny S, Walsh C, Lindsay S, Moloney G, Morris T, Jones S, Rogers TR. Identification of a novel mutation at the primary dimer interface of GyrA conferring fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015 Dec;3(4):295-299. DOI: 10.1016/j.jgar.2015.09.007
83. Heidari H, Ebrahim-Saraie HS and Bazargani A. Toxin profiles and antimicrobial resistance patterns among toxigenic clinical isolates of *Clostridioides (Clostridium) difficile*. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(7):813-819.
84. Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:137-159. DOI: 10.1007/978-3-319-72799-8_9
85. Smits WK, Roseboom AM, Corver J. Plasmids of *Clostridioides difficile*. *Curr Opin Microbiol*. 2022 Feb;65:87-94. DOI: 10.1016/j.mib.2021.10.016
86. Donlan A, Petri WA Jr. The Inflammasome and Type-2 Immunity in *Clostridium difficile* Infection. *Clin Colon Rectal Surg*. 2020 Mar;33(2):67-72. DOI: 10.1055/s-0040-1701231
87. Farooq PD, Urrunaga NH, Tang DM, von Rosenvinge EC. Pseudomembranous colitis. *Dis Mon*. 2015 May;61(5):181-206. DOI: 10.1016/j.disamonth.2015.01.006
88. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*. 2004 Jul 6;171(1):51-8. DOI: 10.1503/cmaj.1031189

Информация об авторах:

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors

Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Sciences), Professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Irina P. Mitsevich, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Обнаружение энтерококков в воде: что изменилось после введения СанПиН 1.2-3685-21

Л.В.Домотенко, Т.П.Морозова, А.П.Шепелин

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

Безопасность питьевой воды – один из самых актуальных вопросов, стоящих перед санитарными службами и организациями системы здравоохранения всего мира. В соответствии с современными требованиями к безопасности воды по санитарно-микробиологическим показателям, приведенными в новых СанПиН 1.2-3685-21, введен обязательный контроль содержания в ней энтерококков. Действующими нормативно-методическими документами регламентирован алгоритм обнаружения энтерококков в воде различных источников. Цель данной работы – анализ действующей нормативно-методической базы, регулирующей использование питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, а также возможности обеспечения лабораторий, проводящих микробиологический анализ воды, отечественными питательными средами.

В работе также рассмотрены вопросы таксономии энтерококков, распространения в окружающей среде, их роли как возбудителей инфекций, возникновения лекарственно-устойчивых штаммов. Проведенный анализ действующих нормативно-методических документов и каталогов продукции отечественных производителей питательных сред показал, что в России налажен промышленный выпуск всего перечня рекомендуемых питательных сред, за исключением хромогенных и флуорогенных.

Ключевые слова: энтерококки, методы выявления и подтверждения, питательные среды

Для цитирования: Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Шепелин А.П. Обнаружение энтерококков в воде: что изменилось после введения СанПиН 1.2-3685-21. Бактериология. 2022; 7(2): 64–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-64-71

Detection of enterococci in water: what has changed after the introduction of SanPiN 1.2-3685-21

L.V.Domotenko, T.P.Morozova, A.P.Shepelin

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

Drinking water safety is one of the most pressing issues facing sanitation services and public health organizations around the world. In accordance with modern requirements for water safety in terms of sanitary and microbiological indicators given in the new SanPiN 1.2-3685-21, mandatory control of the content of enterococci in it has been introduced. The current regulatory and methodological documents regulate the algorithm for detecting enterococci in water from various sources. The purpose of this work is to analyze the current regulatory and methodological framework governing the use of nutrient media for the detection and confirmation of enterococci, as well as the possibility of providing laboratories conducting microbiological water analysis with domestic nutrient media. The paper deals also with the taxonomy of enterococci, distribution in the environment, their role as pathogens of infections, the emergence of drug-resistant strains. The analysis of the current normative and methodological documents and product catalogs of domestic manufacturers of nutrient media showed that there is launched the industrial production of almost the entire list of recommended nutrient media in Russian Federation, with the exception of chromogenic and fluorogenic media.

Key words: enterococci, methods of detection and confirmation, culture media

For citation: Domotenko L.V., Morozova T.P., Shepelin A.P. Detection of enterococci in water: what has changed after the introduction of SanPiN 1.2-3685-21. Bacteriology. 2022; 7(2): 64–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-64-71

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-2170
E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 05.04.2022 г., принята к печати 30.06.2022

For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemical Sciences), Leading Researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279 Russian Federation
Phone: (4967) 36-2170
E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 05.04.2022, accepted for publication 30.06.2022

Безопасность питьевой воды – один из самых актуальных вопросов, стоящих перед санитарными службами и организациями системы здравоохранения всего мира. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) дает определение безопасной и доступной воды как важного фактора здоровья людей, независимо от того, используется ли она для питья, бытовых нужд, приготовления пищи или рекреационных целей [1]. Безопасность воды определяется химической, радиационной и эпидемической безопасностью. Эпидемическая безопасность оценивается по санитарно-микробиологическим и паразитологическим показателям. Санитарно-микробиологические показатели направлены на выявление в исследуемом образце микроорганизмов, имеющих непосредственную связь с человеческим организмом [2].

Учитывая актуальность проблемы безопасности воды, в 2010 г. Генеральная Ассамблея ООН приняла резолюцию, в которой признала «право на безопасную и чистую питьевую воду и санитарии как право человека, имеющее существенно важное значение для полноценной жизни и полного осуществления всех прав человека» [3]. Согласно приведенным в резолюции данным, в настоящее время около 884 млн людей не имеют необходимого доступа к безопасной питьевой воде, а более 2,6 млрд – к водопроводной. Около 1,5 млн детей до пяти лет ежегодно умирают от болезней, связанных с употреблением непригодной для питья воды.

В нашей стране с 2018 г. реализуется национальный проект «Экология», а в его рамках – федеральный проект «Чистая вода», которые направлены на повышение качества питьевой воды для населения, в т.ч. для жителей населенных пунктов, не оборудованных современными системами централизованного водоснабжения, а также на экологическое оздоровление водных объектов [4].

В Государственном докладе «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году» отмечено, что результатом выполнения проектов в 2020 г. стало достоверное снижение удельного веса проб воды, не соответствующих гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям – на 11,40 и 50,54% по сравнению с 2018 и 2011 гг. соответственно. Качество питьевой воды и присутствие в ней различных химических веществ, микробиологических и паразитологических агентов вероятно способствовали формированию 9,24 случая смерти на 100 тыс. всего населения, что составляет 0,75% от показателя общей смертности, и дополнительных случаев заболеваний: 938,07 случая на 100 тыс. всего населения и 1 898,17 случая на 100 тыс. детского населения [5].

Для повышения безопасности и качества воды научно обоснованы и гармонизированы с международными требованиями санитарно-микробиологические обязательные показатели безопасности питьевой воды централизованного водоснабжения (обобщенные колиформные бактерии, *Escherichia coli*) и энтерококки в новых санитарных правилах и нормах СанПиН 1.2.3685-21 [6].

В соответствии с требованиями СанПиН 1.2.3685-21 с 1 января 2022 г. введено обязательное исследование на наличие энтерококков при определении качества и безопасности питьевой воды, воды поверхностных водных объектов и обеззараженных сточных вод, допустимых к сбросу в по-

верхностные водные объекты. Ранее энтерококки рекомендовалось определять только при превышающем нормативы уровне общих колиформных бактерий с низким числом *E. coli* (<50–100 КОЕ в 100 мл воды), а также в случаях несоответствия оценки качества воды по основным показателям и санитарной ситуации на водных объектах.

Введение данного показателя в качестве индикатора фекального загрязнения воды обусловлено способностью энтерококков к более длительному выживанию в водной среде по сравнению с *E. coli* или термотолерантными колиформными бактериями, их большей устойчивостью к высыханию и хлорированию, а также распространением антибиотикоустойчивых штаммов энтерококков, вызывающих тяжелые инфекции [7, 8].

Методология выявления энтерококков в воде регламентирована нормативными документами. На сегодняшний день действуют ГОСТы и методические указания, описывающие технику проведения исследования [9–13]. Среди них ГОСТ 33463.6-2016 по методам гигиенической оценки системы водоснабжения на железнодорожном подвижном составе; ГОСТ 24849-2014 по методам санитарно-бактериологического анализа воды для полевых условий; МУК 4.2.2959-11 по методам санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения и самый новый ГОСТ 34786-2021 по методам определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков в воде питьевой. Следует также отметить ГОСТ ISO 7899-2-2018, подготовленный в Республике Беларусь и принятый Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации. Хотя он не действует в РФ, но является идентичным международному стандарту ISO 7899-2:2000. Известно, что готовятся к выходу новые методические рекомендации.

Общим для всех перечисленных стандартов является использование бактериологического посева на питательные среды. Отличия касаются метода исследования и перечня питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков.

Цель данной работы – анализ действующей нормативно-методической базы, регулирующей использование питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, а также возможности обеспечения лабораторий, проводящих микробиологический анализ воды, отечественными питательными средами.

Материалы и методы. По текстовым электронным базам данных (PubMed, eLIBRARY, Техэксперт, ISO) отобраны и проанализированы нормативные документы и научные работы согласно ключевым словам. После проведенного анализа отобранной литературы в настоящее исследование в соответствии с темой работы было включено 33 источника.

Характеристика и таксономия. Энтерококки (лат. *Enterococcus*) – род повсеместно распространенных грамположительных бактерий, не образующих спор, облигатно ферментативных хемоорганотрофов. Они представляют собой сферические или овальные клетки, расположенные парами или цепочками; каталазоотрицательные, хотя некоторые виды продуцируют псевдокаталазу, и обычно гомоферментативные, продуцирующие молочную кислоту [14].

Подвижность и пигментация различаются у разных видов; пигментированные виды обычно встречаются среди растений.

Согласно современной таксономии род *Enterococcus* принадлежит семейству *Enterococcaceae*, порядку *Lactobacillales*, классу *Bacilli*, типу *Firmicutes* и домену *Bacteria*. До 1984 г. энтерококки относились к стрептококкам группы D, а с 1984 г. на основе анализа геномной ДНК выделены в отдельный род. Род *Enterococcus* включает более 36 видов. На основании молекулярно-генетических признаков все виды энтерококков разделены на 5 групп (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* и *E. cecorum*).

Распространение энтерококков. Энтерококки встречаются в воде, почве, растениях и у животных [15]. У человека, как и у других млекопитающих, эти бактерии в основном обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте в виде комменсалов, входящих в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и выполняющих важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистой оболочки [16]. Их концентрация в фекалиях обычно составляет 10^5 – 10^8 клеток в 1 г [7]. Основными представителями нормальной микробиоты кишечника человека являются *E. faecalis* (90–95%) и *E. faecium* (5–10%).

Энтерококки, как представители нормальной микрофлоры кишечника человека и теплокровных животных, в большом количестве попадают в окружающую среду: в почву, воздух, воду, растения, пищевые продукты. Они выживают в окружающей среде благодаря своей способности легко адаптироваться к различным условиям: растут в диапазоне температур от 10 до 45°C, в 6,5%-м растворе NaCl при pH 9,6 и могут выживать при 60°C в течение 30 мин [14].

Вода различных источников может быть важным средством передачи инфекционных болезней из-за воздействия патогенных и условно-патогенных организмов, присутствующих в водоемах, включая энтерококки.

Энтерококки – возбудители инфекций. Энтерококки могут стать условно-патогенными бактериями, способными вызывать аутоинфекцию, а при накоплении за пределами своей естественной среды обитания – возбудителями множества инфекций (эндокардита, инфекций мочевых путей, простатита, внутрибрюшной инфекции, раневой инфекции и др.) [17]. Клиническое значение имеют виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. mundii*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. pallens* [18]. Отличительной особенностью энтерококков является их способность к образованию биопленок, способствующая устойчивости к целому ряду антибактериальных препаратов, особенно к β -лактамам антибиотикам и аминогликозидам. Многие антибиотики действуют на энтерококки бактериостатически.

В последние годы появились штаммы энтерококков с высокой вирулентностью, обладающие устойчивостью к ванкомицину (vancomycin-resistant enterococcus/VRE). VRE способны вызывать инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [19, 20]. При этом наибольший процент VRE-штаммов характерен для вида *E. faecium*, а вид *E. faecalis* наиболее часто вызывает ИСМП [21]. От пациентов с диагностированной энтерококковой инфекцией были выделены также *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* и *E. raffinosus* [22].

В списке резистентных к лекарственным средствам бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, который опубликован ВОЗ в 2017 г., бактерии *E. faecium*, устойчивые к ванкомицину, входят в группу с высоким уровнем приоритетности для разработки новых антибиотиков [23].

Методы обнаружения энтерококков в воде. Основным методом обнаружения энтерококков в воде является бактериологический метод по выявлению жизнеспособных бактерий с помощью питательных сред.

Молекулярные методы обнаружения энтерококков в питьевой воде находятся в стадии разработки и используются только в исследовательских целях [24, 25]. В качестве мишени для количественной полимеразной цепной реакции исследователи использовали различные гены: *asa1*, *ace*, *culA*, *gelE*, *hyl* [26], *sodA* [27], *ace* и *gelE* [28]. В исследовании TPitkänen et al. показано, что использование подходов на основе рибосомальной рРНК значительно повышает чувствительность обнаружения распространенных фекальных энтерококков в водах окружающей среды [29].

Бактериологические методы. Большинство методов подсчета энтерококков на питательных средах основаны на определении активности фермента β -глюкозидазы (эскулиназы), который присутствует в подавляющем большинстве видов и штаммов энтерококков, а также на регистрации биохимических свойств, специфичных для рода *Enterococcus*, на способности расти при температуре 44–45°C, применении селективных добавок, используемых для подавления роста грамотрицательных микроорганизмов и дифференциации от других грамположительных бактерий [30].

Стандартные методы исследования воды включают методы подсчета энтерококков с помощью метода мембранной фильтрации, титрационного метода (или метода ферментации в пробирках) и качественных (ускоренных) тестов с хромогенным или флуорогенным субстратом.

Метод мембранной фильтрации считается современным золотым стандартом для оценки качества воды на наличие энтерококков [7]. Титрационный метод рекомендуется при анализе мутных образцов воды. Для качественного обнаружения энтерококков в воде стали применяться хромогенные и флуорогенные среды, в том числе в многолуночном формате. В ряде сравнительных исследований различных видов воды с использованием бактериологических методов показано, что метод мембранной фильтрации обладал или большей, или равной чувствительностью с коммерческими тестами на основе флуорогенной среды [31–33].

Действующие отечественные нормативно-методические документы, регламентирующие методы по обнаружению энтерококков в воде и их подтверждению, рекомендуют все три бактериологических метода с использованием питательных сред. В таблице приведен перечень питательных сред, рекомендованных различными нормативными документами (НД) для проведения анализа.

Питательные среды. Выбор питательной среды определяется методом обнаружения энтерококков и требованиями НД. Рекомендуемые для проведения анализа питательные среды можно разделить на две основные группы: для выявления (или определения, подсчета) энтерококков и их подтверждения.

К основным питательным средам для подсчета энтерококков методом мембранной фильтрации относятся энтерококк-агар (аналог m-Enterococcus agar) и среда Сланеца–Бартли. Обе среды содержат 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый (ТТХ), который восстанавливается бактериями до нерастворимого формазана, обуславливая темно-красный цвет колоний. Все темно-бордовые колонии, появившиеся при повышенных температурах инкубирования (44–45°C), предположительно можно относить к энтерококкам.

Некоторые стандарты рекомендуют использовать для обнаружения энтерококков желчь-эскулин-азидный агар (Bile Esculin Azide Agar), который рекомендован также для их предварительной идентификации (или подтверждения), основанной на способности энтерококков гидролизовать эскулин. Данная питательная среда содержит желчь, подавляющую рост грамположительных организмов, и азид натрия, ингибирующий рост грамотрицательных микроорганизмов. В состав среды входит цитрат железа. Энтерококки, вырабатывающие фермент эскулиназу, гидролизуют эскулин до

эскулетина (6,7-дигидроксикумарин) и глюкозы. Эскулетин реагирует с цитратом железа, образуя фенольный комплекс железа, который окрашивает питательную среду в цвет от темно-коричневого до черного.

Следует отметить, что название питательной среды – желчь-эскулин-азидный агар – образовано от английского Bile Esculin Azide Agar, и в отечественных НД могут встречаться аналогичные названия данной питательной среды: желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, желчно-эскулин-азидная среда и др., которые отражают присутствие в составе желчи, эскулина и азиды натрия.

Рекомендуемый требованиями ГОСТ 34786-2021 агар с канамицином, эскулином и азидом натрия (Kanamycin esculin azide agar) подавляет рост сопутствующей бактериальной флоры за счет присутствия канамицина и азиды натрия. Образующийся эскулетин формирует комплекс с трехвалентным железом, окрашивая питательную среду в месте роста энтерококков в цвет от оливково-зеленого до черного.

Таблица. Перечень питательных сред для обнаружения и подтверждения энтерококков в воде

НД	Наименование	Питательные среды
ГОСТ 34786-2021	Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и энтерококков	Метод мембранной фильтрации: Для определения: • среда Сланеца–Бартли; • энтерококковый агар Chromocult; • энтерококковый (азидный) агар; • стрептококковый агар KF (KF Streptococcus Agar); • основа хромогенного агара для кишечных энтерококков (m-EI Chromogenic Agar Base); • агар желчно-эскулиновый с азидом натрия (желчь-эскулин-азидный агар). Для подтверждения: • микроскопия; • солевой агар с ТТХ; • каталазный тест. Качественный метод: • среда Readycult Enterococci 100 или аналогичная; • тест-набор Enterolert-DW или аналогичный на основе хромогенного бульона. Определение НВЧ энтерококков: • тест-система Quanti-Tray и тест-набор Enterolert-DW или аналогичные
ГОСТ РБ ГОСТ ISO 7899-2—2018	Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации	• Среда Сланеца–Бартли; • желчно-эскулиновый агар с азидом
ГОСТ 33463.6—2016	Системы жизнеобеспечения на железнодорожном подвижном составе. Часть 6. Методы гигиенической оценки системы водоснабжения	Метод мембранной фильтрации Для определения: • энтерококк-агар; • среда Сланеца–Бартли. Для подтверждения: • тест-системы для идентификации энтерококков или • солевой агар с ТТХ; • желчь-эскулин-азидный агар. Ускоренное выявление: • готовые питательные среды на подложках. Сигнальный метод: • хромогенный бульон
ГОСТ 24849-2014	Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий	Метод мембранной фильтрации: Для выявления: • энтерококк-агар или другая азидная среда с ТТХ (например, азидная среда Сланеца–Бартли). Для подтверждения: • тест-системы для идентификации энтерококков; • или питательные среды: • солевой агар с ТТХ; • желчь-эскулин-азидный агар. Для ускоренного выявления: • готовые питательные среды на подложках. Сигнальный метод: • Хромогенный бульон

Таблица. Перечень питательных сред для обнаружения и подтверждения энтерококков в воде (окончание)

МУК 4.2.2959-11	Методы санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения: Методические указания	Метод мембранной фильтрации: Для выделения: • среда Сланеца–Бартли или энтерококк-агар. Для подтверждения: • микроскопия; • солевой агар с ТТХ; • каталазный тест. Титрационный метод: • накопительная щелочно-полимиксиновая среда; • среды для пересева: • молочно-ингибиторная (МИС) или энтерококк-агар, или среда Сланеца–Бартли. Упрощенный метод: • титрационный метод с использованием лактозо-пептонной среды для накопления обобщенных колиформных бактерий (ОКБ) и одновременно энтерококков, затем пересев на МИС, среду Сланеца–Бартли или энтерококк-агар
МУК 4.2.xxxx-21 (проект)	Бактериологические методы исследования воды. Методические указания по методам контроля	Метод мембранной фильтрации Выявление: • среда Сланеца–Бартли; • энтерококк-агар; • желчно-эскулин-азидная среда или азидный агар с канамицином и эскулином (готовая питательная среда) или другие среды аналогичного качества. Подтверждение: • микроскопия; • солевой агар с ТТХ; • каталазный тест. Титрационный метод: • 1-й этап –щелочно-полимиксиновая среда; • 2-й этап – МИС, энтерококкагар, среда Сланеца–Бартли, желчь-эскулин-азидная сред или азидный агар с канамицином и эскулином. Упрощенный метод: • титрационный метод с использованием лактозо-пептонной среды для накопления ОКБ и одновременно энтерококков, затем пересев на МИС, среду Сланеца–Бартли или энтерококк-агар. Качественный метод: • среда Readycult Enterococci 100

Для выявления энтерококков в воде разрешены к использованию хромогенные среды, например m-El Chromogenic Agar Base – селективная среда для обнаружения и подсчета энтерококков в воде методом мембранной фильтрации. Появление колоний синего цвета подтверждает наличие энтерококков. Различные по объему и разведению пробы могут быть протестированы с помощью данной процедуры одноступенчатой мембранной фильтрации для обнаружения и подсчета энтерококков в питьевой, пресной, родниковой и морской воде. Пептон и дрожжевой экстракт являются источниками питательных веществ, необходимых для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот. Эскулин гидролизруется энтерококками с образованием эскулетина и декстрозы. Циклогексими́д ингибирует большинство грибов, азид натрия ингибирует грамотрицательные бактерии. Х-глюкозид является субстратом для глюкозидазоположительных энтерококков.

Другая разрешенная хромогенная среда Enterococci-Agar for microbiology Chromocult – селективная среда для выделения, дифференциации и подсчета энтерококков в воде, пищевых продуктах и других образцах. Рост энтерококков в среде усилен в результате тщательно отобранного состава пептонов, добавлением в среду фосфатов и твина-80. Азид натрия и соли желчных кислот ингибируют рост сопутствующей микрофлоры. Энтерококки расщепляют специфические хромогенные субстраты, входящие в состав среды, приводя к красному окрашиванию колоний, что позволяет их легко дифференцировать от бесцветных, синих/фиолетовых или бирюзовых колоний других микроорганизмов.

Обнаружение энтерококков титрационным методом согласно международному методу 9230 B Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition [<https://www.standardmethods.org/>] предполагает использование азид-глюкозного бульона (Azide dextrose broth) для посева соответствующих разведений образца воды. При появлении помутнения бульона проводят подтверждающий тест на энтерококки путем посева на желчь-эскулин-азидный агар. Для получения большей точности (90%) выросшие коричнево-черные колонии с коричневыми ореолами подвергают дальнейшей идентификации.

В соответствии с требованиями МУК 4.2.2959-11 титрационный метод проводят с использованием накопительной щелочно-полимиксиновой среды с дальнейшим пересевом на энтерококк-агар, среду Сланеца–Бартли или молочно-ингибиторную среду.

Для быстрого обнаружения энтерококков в воде нормативными документами (ГОСТ 34786-2021, ГОСТ 33463.6-2016, ГОСТ 24849-2014) рекомендован качественный (сигнальный) метод с использованием хромогенных бульонов. Метод позволяет подтвердить наличие кишечных энтерококков в пробе воды по изменению цвета среды через 18–24 ч инкубирования.

Импортозамещающие питательные среды. Практически весь перечень питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, рекомендованных нормативными документами, выпускается отечественными производителями. В частности, в нашем центре налажено промышленное производство основных питательных сред для энте-

рококков: энтерококк-агара, среды Сланеца–Бартли и желчь-эскулин-азидного агара, используемых при выполнении метода мембранной фильтрации в соответствии с требованиями международных и российских нормативных документов. Энтерококк-агар уже хорошо зарекомендовал себя в микробиологических лабораториях при исследовании различных образцов. Среда Сланеца–Бартли и желчь-эскулин-азидный агар недавно разработаны по программе импортозамещения.

Щелочно-полимиксиновая среда и молочно-ингибиторная среда, необходимые для титрационного метода, производятся другими фирмами. Рекомендованные для качественного (ускоренного) метода хромогенные и флуорогенные среды пока в нашей стране не выпускаются. Но нами уже намечены возможные пути решения этой проблемы.

Заключение

Проведенный анализ действующей нормативно-методической базы, регулирующей использование питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, и каталогов продукции отечественных фирм – производителей питательных сред показал, что в России налажен промышленный выпуск практически всего перечня рекомендуемых питательных сред, особенно для выполнения анализа воды с помощью основного метода мембранной фильтрации.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Питьевая вода [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water> (дата обращения 20.06.2022).
2. Игнатъева ЛП, Потапова МО. Критерии качества воды поверхностных и подземных источников. Эколого-гигиеническая оценка качества питьевой воды, воды водоемов. Иркутск, 2014, 20 с.
3. Право человека на воду и санитарию. Резолюция, принятая на 64-й сессии Генеральной Ассамблеи ООН 28 июля 2010 года. A/RES/64/292. [Электронный ресурс]. URL: <https://undocs.org/ru/A/RES/64/292>
4. О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2020 году. Государственный доклад. М.: Минприроды России; МГУ имени М.В.Ломоносова; 2021, 864 с.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021, 256 с.
6. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания: СанПиН 1.2.3685-21. Утверждены постановлением Главного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. №2 и введены в действие 01.03.2021.
7. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A. Enterococci in the environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2012;76(4):685-706. DOI: 10.1128/mmbr.00023-12
8. Rodrigues C, Cunha MA. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: indicators and methods. Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration. 2017;2(1). DOI: 10.1007/s41207-017-0035-8
9. Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков: ГОСТ 34786-2021. Дата введения 01.01.2022.
10. Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации: ГОСТ ISO 7899-2-2018 (ГОСТ РБ, в РФ не действует).
11. Системы жизнеобеспечения на железнодорожном подвижном составе. Часть 6 Методы гигиенической оценки системы водоснабжения: ГОСТ 33463.6-2016. Дата введения 01.01.2017.
12. Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий: ГОСТ 24849-2014 Дата введения 01.01.2016.
13. Методы санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения: Методические указания. Дата введения:29.07.2011. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 114 с.
14. Бондаренко ВМ, Суворов АН. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. М.: Медицина; 2007, 30 с.
15. Никонов ЕЛ, Попова ЕН, ред. Микробиота. М.: Медиа Сфера; 2019, 256 с.
16. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: Отраслевой стандарт (ОСТ 91500.11.0004-2003). Приказ Минздрава России №231 от 09.06.2003.
17. Любимова АВ, Шаляпина НА, Колоджиева ВВ, и др. Эпидемиология ванкомицин-резистентных энтерококков в отделениях различного профиля. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(4):48-52.
18. Daniel DS, Lee SM, Gan HM, Dykes GA, Rahman S. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. J Infect Public Health. 2017 Sep-Oct;10(5):617-623. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.02.006
19. De Filippis ML, McKee, eds. Molecular typing in bacterial infections, infectious disease. New York: Springer Science. 2012, p. 17-23.
20. Фёдорова АВ, Клясова ГА, Фролова ИН, Хрульнова СА, Ветихина АВ, Капорская ТС, Молчанова ИВ. Антибиотикорезистентность *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из гемокультуры от больных с опухолями системы крови, в разные периоды исследования. Онкогематология. 2021;16(1):54-63. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-1-54-63
21. Růžicková M, Vítězová M, Kushkevych I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. Open Medicine. 2020;15(1):211224. DOI: 10.1515/med-2020-0032
22. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990;3:46-65.
23. Домотенко, ЛВ, Шепелин АП. Лабораторная диагностика чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Справочник заведующего КДЛ. 2017;8. [Электронный ресурс]. URL: <https://e.zavkdl.ru/577849> (дата обращения: 20.06.2022).
24. Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier JL, Huppé V, Bérubé E, et al. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. Water Res. 2011 Mar;45(6):2342-54. DOI: 10.1016/j.watres.2011.01.019
25. Maheux AF, Huppé V, Bissonnette L, Boissinot M, Rodrigue L, Bérubé É, Bergeron MG. Comparative analysis of classical and molecular microbiology methods for the detection of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in well water. J Environ Monit. 2012 Nov;14(11):2983-9. DOI: 10.1039/c2em30565h

26. Wei L, Wu Q, Zhang J, Guo W, Chen M, Xue L, et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Enterococcus faecalis* Isolates from Mineral Water and Spring Water in China. *Front Microbiol.* 2017 Jun 16;8:1109. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109
27. Devajani D, Dutta TK, Ralte L, et al. Molecular detection of *Enterococcus* with special reference to *Enterococcus faecalis* from water sources and its antimicrobial resistance. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2021;9(2):287-94.
28. Adeniji OO, Sibanda T, Okoh AI. Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of *Enterococcus* species isolated from coastal water in the Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Environmental Studies.* 2021;78(2):208-27. DOI: 10.1080/00207233.2020.1785759
29. Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol.* 2013;47(23):13611-20. DOI: 10.1021/es403489b
30. Guidance on the use of Enterococci as an Indicator in Canadian Drinking Water Supplies. Ottawa: Ontario Health Canada. 2020. 25 p.
31. Adcock PW, Saint CP. Development of glucosidase agar for the confirmation of water-borne *Enterococcus*. *Water Res.* 2001 Dec;35(17):4243-6. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00125-7
32. Kinzelman J, Ng C, Jackson E, Gradus S, Bagley R. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):92-6. DOI: 10.1128/AEM.69.1.92-96.2003
33. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Huppé V, Bissonnette L, Bernier JL, et al. Analytical limits of three beta-glucosidase-based commercial culture methods used in environmental microbiology, to detect enterococci. *Water Sci Technol.* 2009;60(4):943-55. DOI: 10.2166/wst.2009.428
10. Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2. Membrane filtration method: GOST ISO 7899-2-2018 (GOST RB, not valid in the Russian Federation). (In Russian).
11. Life support systems on railway rolling stock. Part 6 Methods for hygienic assessment of the water supply system: GOST 33463.6-2016. Date of introduction 01.01.2017. (In Russian).
12. Water. Methods of sanitary and bacteriological analysis for field conditions: GOST 24849-2014 Date of introduction 01.01.2016. (In Russian).
13. Methods of sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of coastal waters of the seas in places of water use of the population. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 114 p. (In Russian).
14. Bondarenko VM, Suvorov AN. Symbiotic enterococci and problems of enterococcal opportunistic infection. Moscow: "Medicine" Publ., 2007. 30 p. (In Russian).
15. Nikonov EL, Popova EN (eds.). Microbiota. Moscow: "Media Sfera" Publ.; 2019, 256 p. (In Russian).
16. Protocol for the management of patients. Intestinal dysbacteriosis: industry standard (OST 91500.11.0004-2003). Order of the Ministry of Health of Russia No. 231 dated 09.06.03 (In Russian).
17. Lyubimova AV, Chalyapina NA, Kolodzieva VV, et al. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in departments of various profiles. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2016;15(4):48-52. (In Russian).
18. Daniel DS, Lee SM, Gan HM, Dykes GA, Rahman S. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *J Infect Public Health.* 2017 Sep-Oct;10(5):617-623. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.02.006
19. De Filippis ML, McKee, eds. Molecular typing in bacterial infections, infectious disease. New York: Springer Science. 2012, p. 17-23.
20. Fedorova AV, Klyasova GA, Frolova IN, Khrulnova SA, Vetokhina AV, Kaporskaya TS, Molchanova IV. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, isolated from blood culture of patients with hematological malignancies during different study periods. *Oncohematology.* 2021;16(1):54-63. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-1-54-63 (In Russian).
21. Růžicková M, Vítězová M, Kushkevych I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open Medicine.* 2020;15(1):211224. DOI: 10.1515/med-2020-0032
22. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:46-65.
23. Domotenko LV, Shepelin AP. Laboratory diagnostics of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Directory of the head of the CDL. 2017;8. URL: <https://e.zavkdl.ru/577849> (дата обращения: 20.06.2022). (In Russian).
24. Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier JL, Huppé V, Bérubé E, et al. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Res.* 2011 Mar;45(6):2342-54. DOI: 10.1016/j.watres.2011.01.019
25. Maheux AF, Huppé V, Bissonnette L, Boissinot M, Rodrigue L, Bérubé É, Bergeron MG. Comparative analysis of classical and molecular microbiology methods for the detection of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in well water. *J Environ Monit.* 2012 Nov;14(11):2983-9. DOI: 10.1039/c2em30565h
26. Wei L, Wu Q, Zhang J, Guo W, Chen M, Xue L, et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Enterococcus faecalis* Isolates from Mineral Water and Spring Water in China. *Front Microbiol.* 2017 Jun 16;8:1109. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109
27. Devajani D, Dutta TK, Ralte L, et al. Molecular detection of *Enterococcus* with special reference to *Enterococcus faecalis* from water sources and its antimicrobial resistance. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2021;9(2):287-94.
28. Adeniji OO, Sibanda T, Okoh AI. Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of *Enterococcus* species isolated from coastal water in the Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Environmental Studies.* 2021;78(2):208-27. DOI: 10.1080/00207233.2020.1785759

References

29. Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol*. 2013;47(23):13611-20. DOI: 10.1021/es403489b
30. Guidance on the use of Enterococci as an Indicator in Canadian Drinking Water Supplies. Ottawa: Ontario Health Canada. 2020. 25 p.
31. Adcock PW, Saint CP. Development of glucosidase agar for the confirmation of water-borne *Enterococcus*. *Water Res*. 2001 Dec;35(17):4243-6. DOI: 10.1016/s0043-1354(01)00125-7
32. Kinzelman J, Ng C, Jackson E, Gradus S, Bagley R. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jan;69(1):92-6. DOI: 10.1128/AEM.69.1.92-96.2003.
33. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Huppé V, Bissonnette L, Bernier JL, et al. Analytical limits of three beta-glucosidase-based commercial culture methods

used in environmental microbiology, to detect enterococci. *Water Sci Technol*. 2009;60(4):943-55. DOI: 10.2166/wst.2009.428

Информация об авторах:

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Tatiana P. Morozova, Researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

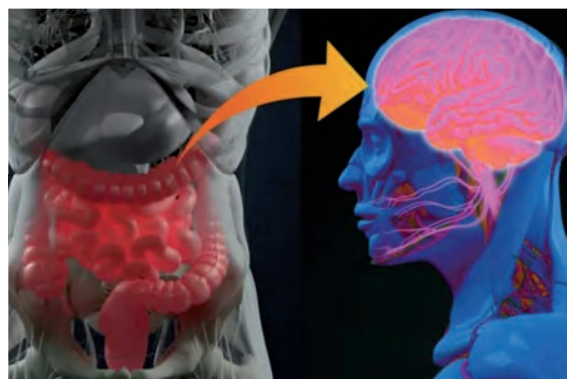
Кишечный бактериофаг связан с лучшей памятью у животных и людей

Триллионы микробов живут в нашем желудочно-кишечном тракте, и все эти клетки имеют свои собственные геномы и белки, многие из которых могут воздействовать на наш организм. Ученые узнают больше о различных способах влияния кишечных микробов на наш мозг и поведение. Новое исследование привлекло внимание к вирусам, живущим в кишечном микробиоме, который иногда называют кишечным вириомом.

Группа ученых показала, что бактериофаги, называемые *Caudovirales* и *Microviridae*, являются важными членами вириома кишечника и связаны с изменениями в тестах памяти и исполнительных функциях. Более высокие уровни фага под названием *Microviridae* были связаны с нарушением исполнительных функций, в то время как более высокие уровни *Caudovirales* были связаны с улучшением памяти. Эти тенденции сохранялись в моделях мышей и плодовых мух, а также в людях.

Это исследование также показало, что люди, которые потребляли больше молочных продуктов, имели более высокий уровень *Caudovirales* в микробиоме кишечника. Предыдущая работа других ученых показала, что люди, которые едят больше молочных продуктов, лучше справляются с когнитивными тестами, что, похоже, подтверждает эти выводы.

Это исследование выявило больше информации об одном аспекте взаимоотношений между микробиомом и мозгом, так называемой оси кишечник-мозг, но предстоит еще много работы, особенно если учесть, что в кишечнике обитает гораздо больше видов бактериофагов. и их воздействие может быть опосредовано бактериями, которые они заражают. Однако исследование показало, что изменения в диете могут улучшить когнитивные функции и память у людей.



Gut Bacteriophage Linked to Better Memory in Animals & Humans | Microbiology [Электронный ресурс]. URL: <https://www.labroots.com/trending/microbiology/22303/gut-bacteriophage-linked-memory-animals-humans> (дата обращения: 01.03.2022).

Роль клеток-персистеров в организме человека

А.Б.Хайтович, А.А.Грищенко

Институт «Медицинская академия им. С.И.Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И.Вернадского», Симферополь, Российская Федерация

Одной из основных проблем современного здравоохранения является проблема нерационального использования антибиотикотерапии, что приводит к высокому уровню смертности от инфекционных болезней. Это обусловлено многими факторами, наиболее важным из которых является бесконтрольное использование антимикробных препаратов среди населения, что привело к возникновению лекарственно-резистентных штаммов бактерий. В связи с этим возникает необходимость в изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Изучены генетические основы выработки устойчивости бактерий и их биохимические механизмы. Как было установлено в ходе исследований, одним из таких механизмов является формирование клеток-персистеров. Это небольшая субпопуляция клеток, которая представляет собой фенотипический вариант изогенной популяции, способный сохранять жизнедеятельность в условиях действия антибиотиков или факторов окружающей среды (окислительный и кислотный стресс, гипоксия, тепловой шок, недостаток питательных веществ). Однако после появления благоприятных условий клетки-персистеры способны рекультивироваться и образовывать новую генерацию вегетативных клеток. В статье рассматриваются явление персистенции и роль клеток-персистеров в организме человека.

Ключевые слова: клетки-персистеры, молекулярно-генетические механизмы, персистенция бактерий, антибактериальные препараты, резистентность

Для цитирования: Хайтович А.Б., Грищенко А.А. Роль клеток-персистеров в организме человека. Бактериология. 2022; 7(2): 72–77. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-72-77

The role of persister cells in the human body

A.B.Khaitovich, A.A.Grishchenko

S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

One of the main problems of modern health care is the problem of antibiotic therapy, which leads to a high mortality rate from infectious diseases. This is due to many factors, the most important of which is the uncontrolled use of antimicrobial drugs among the population, which has led to the emergence of drug-resistant strains of bacteria. In this regard, there is a need to study the molecular mechanisms underlying the formation of resistance in microorganisms. The genetic foundations of the formation of bacterial resistance and their biochemical mechanisms have been studied. As has been established by research, one of these mechanisms is the formation of persister cells. This is a small subpopulation of cells, which is a phenotypic variant of an isogenic population that is able to maintain vital activity in the presence of antibiotics or environmental factors (oxidative and acid stress, hypoxia, heat shock, lack of nutrients). However, after the onset of favorable conditions, persistent cells are able to reclaim and form a new generation of vegetative cells. The article examines aspects of the essence and role of persister cells in the human body.

Key words: persister cells, molecular genetic mechanisms, bacterial persistence, antibacterial drugs, resistance

For citation: Khaitovich A.B., Grishchenko A.A. The role of persister cells in the human body. Bacteriology. 2022; 7(2): 72–77. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-72-77

В 1942 г. Hobby G.L. обнаружил отсутствие полного лизиса культуры *Staphylococcus aureus* пенициллином, так как небольшое количество бактериальных клеток оставались жизнеспособными, дающими рост новой популяции после прекращения действия антибиотиков [1]. В 1944 г.

ирландский врач Bigger J.W., проводящий исследования в Англии, поставив опыты по влиянию пенициллина на *S. aureus*, обратил внимание на то, что под действием антибиотика бактериальная суспензия становилась прозрачной, так как происходил лизис микроорганизмов. Однако после

Для корреспонденции:

Хайтович Александр Борисович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Института «Медицинская академия им. С.И.Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

Адрес: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7

Телефон: (3652) 55-4934

E-mail: khaytovych@rambler.ru

ORCID: 0000-0001-9126-1182

Статья поступила 30.03.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Alexander B. Khaitovich, MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadsky Crimean Federal University

Address: 5/7 Lenin blvd, Simferopol, 295051, Russian Federation

Phone: (3652) 55-4934

E-mail: khaytovych@rambler.ru

ORCID: 0000-0001-9126-1182

The article was received 30.03.2022, accepted for publication 30.06.2022

переноса лизата на агаризованную среду выявлялся рост небольшого числа колоний, а при повторной инокуляции клеток на новую среду, с последующей обработкой пенициллином, вновь образовывались новые колонии. На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что оставшиеся клетки не являются мутантами, устойчивыми к антибиотикам, а представляют собой субпопуляцию неделящихся, бездействующих клеток, которые были названы клетками-персистером [2, 3].

Около 40 последующих лет на результаты исследований не обращали внимания [4], но позднее было выявлено, что при обработке популяции другими антибиотиками часть бактерий также сохраняла жизнеспособность [5].

В 1980-е гг. Moyed H.S. возобновил исследования, связанные с персистирующими клетками [6]. Для объяснения наличия фенотипических вариаций в генетически однородных бактериальных популяциях он пытался создать мутантные штаммы, которые могут образовывать большее количество бездействующих клеток. Для этого был применен метод накопления, в основе которого лежала многократная обработка суспензии бактерий антибиотиком с дальнейшим изъятием клонов с высокими значениями минимальной подавляющей концентрации (МПК). Отбирались бактерии с неизменной МПК и большим числом клеток, невосприимчивых к колебаниям pH, антибиотическим средствам, тепловому шоку. При получении достаточного количества клеток-персистеров изучалась экспрессия генов, детерминирующих синтез внутриклеточных ингибиторов [5].

В 1990-е гг. начались исследования свойств микробных биопленок. Полученные результаты по устойчивости биопленок и одновременному отсутствию признаков антибиотикорезистентности у бактерий привлекли внимание ученых и привели к дальнейшему изучению клеток-персистеров [7–9]. В проведенных исследованиях с использованием разных доз антибиотиков на бактерии биопленок *Pseudomonas aeruginosa* в популяции были обнаружены клетки, устойчивые ко всем известным в то время антимикробным средствам [10, 11]. Аналогичные результаты были получены в отношении бактерии *Escherichia coli*. При изучении биопленок, синтезированных *E. coli*, с применением флуоресцентной микроскопии были обнаружены клетки небольшого размера, бледно окрашенные по Граму и обладающие свойствами клеток-персистеров [12, 13]. Для идентификации бездействующих клеток дополнительно использовали метод проточной цитометрии и некоторые молекулярно-генетические методы. Впоследствии было установлено, что клетки-персистеры являются покоящимися формами бактерий и обладают резистентностью к действию неблагоприятных факторов окружающей среды [14–16].

Многие исследователи оценили клетки-персистеры и антибиотикорезистентные бактерии как тождественные понятия, так как результат воздействия был схожий – основным свойством обоих явлений являлось устойчивость к летальному действию антимикробных средств. Однако после более детальных исследований к 1980-м гг. пришло понимание существенных отличий между этими явлениями [14–16].

Цель работы – изучить сущность клеток-персистеров и их влияние на развитие заболеваний в организме человека.

Задачи работы: обсуждение понятия клеток-персистеров, молекулярно-генетических механизмов их образования; выявление различий между антибиотикорезистентностью, вызванной мутациями, и естественной устойчивостью персистирующих клеток; установление роли клеток-персистеров в биопленках и выявление условий, способствующих формированию персистенции.

Материалы и методы: проведен анализ отечественной и иностранной научной литературы по проблеме персистирующих бактериальных клеток.

Невозможность получения летального эффекта антимикробными препаратами обусловлена временной невосприимчивостью небольшого количества бактерий, которое называли бактериальной персистенцией (впервые описано у *S. aureus*) [1, 3]. Известно, что большинство бактериальных культур, находясь в стационарной фазе роста и при благоприятных условиях, содержат небольшую (1–3%) фенотипическую субпопуляцию клеток-персистеров, биологической функцией которых является сохранение популяции после длительного действия неблагоприятных факторов окружающей среды: антимикробных препаратов, дефицита питательных веществ, изменения температуры, оксидативного и кислотного стресса, гипоксии [8]. При исследовании этого феномена было установлено, что в клетках-персистером происходит ингибирование основных внутриклеточных звеньев метаболизма и репродукции: синтеза белков, клеточной стенки и репликации нуклеиновых кислот [2].

В экстремальных условиях происходит трансформация вегетативных форм в неделящиеся, персистирующие бактерии, при этом число таких клеток может варьировать вплоть до полного перехода всей популяции в состояние персистенции [17]. При наступлении благоприятных условий клетки рекультивируются в течение нескольких часов в активное состояние, при котором они чувствительны к антибиотикам, и формируют новую генерацию вегетативных клеток. Это свойство является ключевым отличием персистеров от резистентных мутировавших клеток, поскольку персистенция бактерий может быть временным и обратимым явлением [2, 18]. Присутствие в организме неактивных клеток приводит к возникновению персистирующих инфекций, при которых наблюдается повышенный риск распространения, увеличение заболеваемости и смертности [18].

В начале XXI века научный прогресс в области молекулярно-генетических механизмов бактериальной персистенции позволил культивировать одиночные клетки для исследования их жизнеспособности и физиологии. Были изобретены и предложены для оценки новые аналитические инструменты и методы изоляции отдельных клеток: компартиментализация, микрофлюидика, рамановская спектроскопия, проточная цитометрия, молекулярно-генетические методы. *Компартиментализация* – это дифференциация клеток эукариот на участки, отграниченные мембраной, в которых протекают различные метаболические процессы. *Микрофлюидика* – изучение движений микропотоков и малых объемов жидкостей. *Рамановская спектроскопия* – метод, основанный на взаимодействии вещества со светом, с помощью которого проводят индикацию возбудителя, что позволяет исследовать структуру бактерии. *Проточная цитометрия* – метод для быстрого оптического анализа отдель-

ных клеток. В зависимости от целей исследований эти методы сочетаются с секвенированием РНК, а также генетическим, пространственным, макромолекулярным, протеомным профилированием одиночных клеток. Посредством этих методов было обнаружено, что в регуляции персистеров участвует ряд молекулярных механизмов [19–21].

Установлено, что жизненный процесс микроорганизмов тесно сопряжен с влиянием внутреннего и наружного «молекулярного шума», который предполагает неупорядоченные колебания концентраций различных молекул и воздействует на степень экспрессии генов в отдельных клетках. Процесс «усиления шума» приводит к формированию состояния би-стабильности, то есть к образованию двух или более устойчивых фенотипически различных субпопуляций клеток, которые сосуществуют в общей генетически идентичной популяции [22].

Молекулярно-генетический механизм формирования клеток-персистеров определяется тем, что бактерии посредством своих сенсорных систем воспринимают внешние раздражения, в ответ на которые вырабатывают внутриклеточные мессенджеры-индукторы (p)ppGpp (гуанозин пентафосфат и гуанозин тетрафосфат), принимающие участие в регуляции активности метаболизма бактерий [23]. Концентрация (p)ppGpp регулируется ppGpp-синтетазами, активность которых зависит от наличия аминокислот и участия гормонов RelA/SpoT (белки-гомологи, которые включают суперсемейство ферментов, синтезирующих или гидролизующих алармон ppGpp, активатор «строгого» ответа и регулятор клеточного метаболизма) [24]. Мессенджеры-индукторы влияют на формирование клеток-персистеров, изменяя активность внутриклеточных ферментов (ДНК-праймазы, РНК-полимеразы, лизиндекарбоксилазы), и, как результат, регулируют метаболическую активность и скорость репликации бактерий [24–26]. В последние десятилетия было выяснено, что ppGpp действуют на активность генетических оперонов, кодирующих токсин-антитоксиновую систему бактерий. Эта система состоит из двух генетических элементов: гена *hipA*, кодирующего стабильный токсин и обуславливающего образование белка HipA, и гена *hipB*, кодирующего лабильный антитоксин и инициирующего синтез белка HipB [27]. В благоприятных условиях антитоксин инактивирует токсин путем прямого связывания мРНК. Исследования механизма влияния белка HipA показали, что он является серин/треонин-киназой, которая посредством фосфорилирования ингибирует глутамил-Т-РНК-синтетазу, что приводит к накоплению не-связанной глутамил-Т-РНК и образованию ppGpp. Наличие высоких концентраций ppGpp стимулирует уменьшение активности экзополифосфатазы – фермента, расщепляющего полифосфаты. Благодаря этому происходит накопление полифосфатов, что приводит к стимуляции Lon-протеиназы, которая расщепляет антитоксины токсин-антитоксиновой системы. Результатом является увеличение содержания токсинов, что обуславливает ингибирование синтеза белка, клеточной стенки, внутриклеточных ферментов, в целом метаболизма и обеспечивает формирование клеток-персистеров [28].

В настоящее время обнаружено 8 механизмов влияния ТА-систем [5, 29], определяемых различными клеточными мишенями токсинов: (1) расщепление мРНК, токсином RelE,

связанных с А-сайтом рибосомы [29]; (2) разрезание не связанных с рибосомой одноцепочечных мРНК при действии MazF, MqsR и HicA [29]; (3) расщепление энтеробактериальным токсином VapC инициаторной тРНК fMet [5]; (4) расщепление нормальных тРНК микобактериальными VapC [29]; (5) разрезание сарцин-рициновой петли 23S рРНК за счет активности VapC20 и VapC23 *Mycobacterium tuberculosis* [29]; (6) фосфорилирование фактора элонгации трансляции *Mycobacterium smegmatis* и EF-Tu-токсинами Doc-профага P1 [29]; (7) ингибирование ДНК-гиразы белками CcdB (гомологом MazF) и ParE (гомологом RelE) [29]; (8) фосфорилирование глутамил-тРНК-синтетазы токсином HipA *E. coli* [29].

Изначально токсин-антитоксиновые локусы были выявлены в составе бактериальных плазмид, которые часто подвергались горизонтальному переносу. В дальнейшем было обнаружено, что они могут располагаться в бактериальных хромосомах. Избыточная активация токсинов ведет к разрушению и гибели клеток, а соответственно, этот процесс может лежать в основе одной из перспективных стратегий, ориентированных на борьбу с персистенцией бактерий и их фенотипической резистентностью к антибиотикам [30].

Проведенные исследования выявили следующие отличия между антибиотикорезистентностью, вызванной мутациями, и естественной устойчивостью персистирующих клеток:

1) **толерантность бактерий** обусловлена фенотипической изменчивостью, которая генетически не передается, в отличие от резистентности бактерий к антибиотикам, связанной с приобретенными генетически детерминированными свойствами в результате мутаций или генетических рекомбинаций, которая передается по наследству [31];

2) одно из самых основных отличий клеток-персистеров – это **неспособность расти и размножаться при высоких концентрациях антибиотиков**, когда в фазе активного роста популяций клетки-персистеры практически отсутствуют, а возрастает их число при замедлении и прекращении роста [31];

3) **МПК персистирующих бактерий и чувствительных бактерий** практически идентична в отличие от антибиотикорезистентных [31];

4) **устойчивость персистирующих клеток к антибиотикам** является обратимым процессом [5];

5) **принцип действия антибиотиков** на физиологически активные клетки заключается в действии на определенные мишени внутри клетки, при этом происходит их подавление или активация, что приводит к внутриклеточному синтезу токсинов, аутолизина и высокореактивных кислородных радикалов и связано с механизмами действия антибиотиков на бактерии [32, 33]. В частности, стрептомицин связывается с малой субъединицей рибосомы; хлорамфеникол и эритромицин взаимодействуют с большой субъединицей рибосомы и осуществляют нарушение этапа трансляции и синтеза белка, инактивируя функции рибосом; фторхинолоны и нитромидазол блокируют репликацию и деление клетки; β-лактамы препараты связываются и инактивируют транспептидазы, ингибируя естественную сборку молекул пептидогликанов – основы клеточной стенки бактерий; рифампицин опосредует ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы; грамицидины и полимиксины вызывают нарушение целостности цитоплазматической мембраны [34]. В то же время в клетках-персистерх все мишени являются

выключенными вследствие блокировки специфическими белками, поэтому клетки-персистеры не растут и не делятся. В неактивном виде находятся бактериальная хромосома и белковые системы репликации, транскрипции и репарации, что указывает на то, что клетки проявляют мультитолерантность, то есть обладают защитой от любых видов антибиотиков в отличие от антибиотикорезистентных бактерий, которые проявляют устойчивость к одному или нескольким видам антимикробных средств [35, 36];

6) при пересеве покоящихся клеток-персистеров на новую среду они способны полностью воспроизвести популяцию, чувствительную к антибиотикам, с аналогичным небольшим количеством персистирующих клеток, что позволяет сохранить популяцию как вид при воздействии стресса разного генеза, а функцией резистентных клеток является выживание в конкретных условиях [37];

7) на практике можно обнаружить клетки-персистеры посредством смены концентрации антибиотика с контролем динамики жизнеспособных клеток, когда выявляется ниспадающая кривая линия с выделяющимися ступенями, сформированными активно растущими и персистирующими клетками, но если обработать суспензию резистентного штамма антибиотиком, то число жизнеспособных бактерий во времени изменяться не будет [8].

Очень важным в биологии бактерий является взаимоотношение способности их к персистенции и возможности образовывать биопленки. Длительное время считалось, что биопленки образуются только на медицинских изделиях, таких как катетеры, контактные линзы, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, другие медицинские изделия, но в настоящее время установлено, что способность к образованию биопленок является основным фактором патогенности, играющим существенную роль в развитии патологического процесса [38].

Биопленки являются одной из форм существования бактерий в природных популяциях и состоят из микробов, которые производят внеклеточный матрикс, включающий белки, полисахариды (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза), гликолипиды и ДНК. Биопленки защищают бактерии от фагоцитоза, клеточного и гуморального иммунитета, дезинфицирующих средств химической природы. Такая защита приводит к дефициту питательных веществ, за счет чего в глубоких слоях биопленки происходит активный переход клеток в персистирующее состояние, поэтому биопленки приобретают способность защищать и от антибиотиков. Они представляют опасность для человеческого организма, поскольку могут приводить к тяжелому протеканию болезней и появлению осложнений, а также переходу патологического процесса в хроническое течение: инфекции мочевыводящих путей, муковисцидозной пневмонии, остеомиелиту, отиту, патологии околозубных тканей и самих зубов и др. Многочисленными исследованиями установлено, что хроническое течение заболеваний может быть связано с тем, что клетки-персистеры могут «прятаться» в клетках гранулем, макрофагах, желчном пузыре, слизистой желудка [38].

Как показал анализ экспериментальных исследований, формированию персистенции способствуют различные факторы, наиболее существенными из них являются:

– реализация стратегии минимизации рисков – когда в бактериальных культурах могут возникать персистирующие клетки без влияния стресса, при фенотипической гетерогенности в пределах генетически однородной культуры, а одним из механизмов выживания популяции в изменяющихся условиях среды является разная реализация генетической информации [39];

– индуцированная персистенция, которая возникает под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды (тепловой шок, окислительный и кислотный стрессы, голодание, гетерогенность условий в биопленках) [3];

– фенотипическая гетерогенность, возникающая под влиянием химических сигналов в условиях феномена «чувство кворума» – межклеточных взаимодействий бактерий в популяциях, когда возможно увеличение количества клеток-персистеров при соединении супернатанта стационарных культур и растущей культуры *P. aeruginosa* [8, 40];

– переход в нерепликативное состояние, когда при взаимодействии «патоген-хозяин», при фагоцитозе макрофагами небольшая часть бактерий захватывается. При встрече с дефицитом питательных веществ и кислой средой в вакуолях макрофагов образуются клетки-персистеры [41].

Таким образом, явление персистенции у бактерий некоторых видов имеют важное значение в биологии возбудителя, что во многом определяет их особенности в устойчивости к факторам окружающей среды и некоторым химиотерапевтическим препаратам, и развитии патологических процессов в организме человека.

Заключение

Проведенный анализ свидетельствует, что в настоящее время нельзя утверждать, что исследователи описали все механизмы персистенции бактерий, выявили все способы предотвращения их появления, возвращения бактерий к активному росту, влияния на уровень выработки токсинов внутри клеток. Изучение феномена персистенции у бактерий продолжается. Полученные новые результаты позволят лучше понимать механизмы развития патологии, а также будут использованы для создания комбинированных схем лечения, которые будут являться более эффективными и с минимальными осложнениями для организма человека.

Информация о финансировании

Работа выполнена за счет бюджетных средств института.

Financial support

The work was carried out at the expense of the budgetary funds of the Institute.

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Proc Soc Exp Biol NY.* 1942;50(2):281-5. DOI: 10.3181/00379727-50-13773

2. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Aug;15(8):453-464. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42
3. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet.* 1944;244(6320):497-500. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3
4. Van den Bergh B, Michiels JE, Fauvart M, Michiels J. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016 Jul;14(7):613-6. DOI: 10.1080/14787210.2016.1194754
5. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci.* 2008 Dec;33(5):795-805. DOI: 10.1007/s12038-008-0099-3
6. Moyed HS, Broderick SH. Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol.* 1986;166:399-403. DOI: 10.1128/jb.155.2.768-775.1983
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318
8. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64:357-372. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
9. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:317-23. DOI: 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
10. Brooun A, Liu S, Lewis A. A Dose-Response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004;4:640-6. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00790
11. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001;183:6746-51. DOI: 10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001
12. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jan 15;230(1):13-8. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00856-5. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett.* 2004 May 1;234(1):187.
13. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 2006 Jun 12;6:53. DOI: 10.1186/1471-2180-6-53
14. Anderl JN, Zahller E, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47:1251-1256. DOI: 10.1128/AAC.47.4.1251-1256
15. Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. Mode of action of penicillin I. Bacterial growth and penicillin activity – *Staphylococcus aureus* FDA. *J Bacteriol.* 1944;48:393-399. DOI: 10.1128/jb.48.4.393-399.1944
16. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol.* 1986 May;132(5):1297-304. DOI: 10.1099/00221287-132-5-1297
17. Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun.* 2015;6:7983. DOI: 10.1038/ncomms8983
18. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 2013;4(4):273-283. DOI: 10.4161/viru.23987
19. Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: Methods and applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 2010;86(5):1281-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2524-4
20. Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc.* 2013;8(5):870-891. DOI: 10.1038/nprot.2013.046
21. Peterson VM, Zhang KX, Kumar N, Wong J, Li L, Wilson DC, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat Biotechnol.* 2017;35(10):936-939. DOI: 10.1038/nbt.3973
22. Eldar A, Elowitz M. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature.* 2010;467:167-173. DOI: 10.1038/nature09326
23. Alawneh AM, Qi D, Yonesaki T, Otsuka Y. An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module. *Mol Microbiol.* 2016;99:188-98 DOI: 10.1111/mmi.13225
24. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, Koh E, Peleg Y, Qimron U, et al. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol Cell.* 2013;50:136-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.02.002
25. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004;186:8172-80. DOI: 10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004
26. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial Persistence by RNA Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108:13206-13211. DOI: 10.1073/pnas.1100186108
27. Black DS, Kelly AJ, Mardis MJ, Moyed HS. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol.* 1991;173:5732-9. DOI: 10.1128/jb.173.18.5732-5739
28. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:103-123 DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150159
29. Замахаев МВ, Гончаренко АВ, Шумков МС. Токсин-антитоксиновые-системы и бактериальная персистенция (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019;55(6):523-534. DOI: 10.1134/S055510991906014X
30. Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by *HipA*. *Mol Cell.* 2013;52:248-54. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.045
31. Браунер А Различение устойчивости, толерантности и устойчивости к лечению антибиотиками. *Обзоры природы. Микробиология.* 2017;14(5):320-30. DOI: 10.1038.2016.34
32. Davis BD, Chen LL, Tai PC. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:6164-8. DOI: 10.1073/pnas.83.16.6164
33. Hooper D. Mechanism of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2001;32(1):9-15. DOI: 10.1086/319370
34. Клиническая фармакология. Под ред. Изможеровой НВ. Екатеринбург: Изд-во УГМУ; 2018, 92 с.
35. Гостев ВВ, Сидоренко СВ. Бактериальные биопленки и инфекции. *Журнал инфектологии.* 2010;2(3):4-15. DOI: 10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15
36. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy.* Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006; 495 p. DOI: 10.1201/9781420028232
37. Тутельян АВ, Гапонов АМ, Писарев ВМ, Эль-Регистан ГИ. Дормантное состояние микроорганизмов и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Терапевтический архив.* 2015;87(11):103-8. DOI: 10.17116/terarkh20158711103-109
38. Каюмова АР, Тризна ЕЮ, Шарафутдинов ИС, Байдашшина ДР, Рыжикова МН. Биопленки как фактор патогенности *Staphylococcus aureus*: подходы к терапии. Казань: Изд-во КФУ; 2017, 99 с.
39. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940;146:837-7. DOI: 10.1038/146837a0
40. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):237-46. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.001
41. Dandekar T, Astrid F, Jasmin P, Hensel M. *Front. Microbiol.* 2012;3(1):164. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00164

References

1. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Proc Soc Exp Biol NY.* 1942;50(2):281-5. DOI: 10.3181/00379727-50-13773
2. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Aug;15(8):453-464. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42

3. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet*. 1944;244(6320):497-500. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3
4. Van den Bergh B, Michiels JE, Fauvart M, Michiels J. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Jul;14(7):613-6. DOI: 10.1080/14787210.2016.1194754
5. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci*. 2008 Dec;33(5):795-805. DOI: 10.1007/s12038-008-0099-3
6. Moyed HS, Broderick SH. Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*. 1986;166:399-403. DOI: 10.1128/jb.155.2.768-775.1983
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318
8. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol*. 2010;64:357-372. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
9. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:317-23. DOI: 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
10. Brooun A, Liu S, Lewis A. A Dose-Response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;4:640-6. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00790
11. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001;183:6746-51. DOI: 10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001
12. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jan 15;230(1):13-8. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00856-5. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett*. 2004 May 1;234(1):187
13. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol*. 2006 Jun 12;6:53. DOI: 10.1186/1471-2180-6-53
14. Anderl JN, Zahller E, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003;47:1251-1256. DOI: 10.1128/AAC.47.4.1251-1256
15. Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. Mode of action of penicillin I. Bacterial growth and penicillin activity – *Staphylococcus aureus* FDA. *J Bacteriol*. 1944;48:393-399. DOI: 10.1128/jb.48.4.393-399.1944
16. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol*. 1986 May;132(5):1297-304. DOI: 10.1099/00221287-132-5-1297
17. Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun*. 2015;6:7983. DOI: 10.1038/ncomms8983
18. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013;4(4):273-283. DOI: 10.4161/viru.23987
19. Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: Methods and applications. *Appl Microbiol. Biotechnol*. 2010;86(5):1281-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2524-4
20. Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc*. 2013;8(5):870-891. DOI: 10.1038/nprot.2013.046
21. Peterson VM, Zhang KX, Kumar N, Wong J, Li L, Wilson DC, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat Biotechnol*. 2017;35(10):936-939. DOI: 10.1038/nbt.3973
22. Eldar A, Elowitz M. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature*. 2010;467:167-173. DOI: 10.1038/nature09326 (In Russian).
23. Alawneh AM, Qi D, Yonesaki T, Otsuka Y. An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module. *Mol Microbiol*. 2016;99:188-98 DOI: 10.1111/mmi.13225
24. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, Koh E, Peleg Y, Qimron U, et al. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol Cell*. 2013;50:136-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.02.002
25. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004;186:8172-80. DOI: 10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004
26. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial Persistence by RNA Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:13206-13211. DOI: 10.1073/pnas.1100186108
27. Black DS, Kelly AJ, Mardis MJ, Moyed HS. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol*. 1991;173:5732-9. DOI: 10.1128/jb.173.18.5732-5739
28. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:103-123 DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150159
29. Zamakhaev MV, Goncharenko AV, Shumkov MS. Toxin-antitoxin systems and bacterial persistence (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(6):571-581. DOI: 10.1134/S055510991906014X (In Russian).
30. Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by *HipA*. *Mol Cell*. 2013;52:248-54. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.045
31. Brauner A Razlichenie ustoichivosti, tolerantnosti i ustoichivosti k lecheniyu antibiotikami. *Obzory prirody. Mikrobiologiya*. 2017;14(5):320-30. DOI: 10.1038.2016.34 (In Russian).
32. Davis BD, Chen LL, Tai PC. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:6164-8. DOI: 10.1073/pnas.83.16.6164
33. Hooper D. Mechanism of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001;32(1):9-15. DOI: 10.1086/319370
34. Clinical pharmacology. Edited by Izmozherova NV. Yekaterinburg, 2018, 92 p. (In Russian).
35. Gostev VV, Sidorenko SV. Bacterial biofilms and infections. *Journal Infectology*. 2010;2(3):4-15. DOI: 10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15 (In Russian).
36. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006; 495 p. DOI: 10.1201/9781420028232
37. Tutelyan AV, Gaponov AM, Pisarev VM, Elregistan GI. Microbial dormancy and prevention of healthcare-associated infections. *Therapeutic archive*. 2015;87(11):103-8. DOI: 10.17116/terarkh20158711103-109 (In Russian).
38. Kayumova AR, Trizna IMI, Sharafutdinov IS, Baydamshina DR, Ryzhikova MN. Biofilms as a pathogenicity factor of *Staphylococcus aureus*: approaches to therapy. Kazan, 2017, 99 p. (In Russian).
39. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146:837-7. DOI: 10.1038/146837a0
40. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell*. 2006 Apr 21;125(2):237-46. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.001
41. Dandekar T, Astrid F, Jasmin P, Hensel M. *Front. Microbiol*. 2012;3(1):164. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00164

Информация об авторе:

Грищенко Алина Александровна, студентка 3-го курса 2-го медицинского факультета группы 193(1) Института «Медицинская академия им. С.И.Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»
ORCID:0000-0003-2542-4240

Information about author:

Alina A. Grishchenko, 3rd year student, 2nd Faculty of Medicine, Group 193 (1) of S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadsky Crimean Federal University
ORCID:0000-0003-2542-4240

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