ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Бактериология, 2023, том 8, №2, с. 8–19
Bacteriology, 2023, volume 8, No 2, p. 8–19

DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-8-19

Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 1)

Э.А.Светоч, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, М.В.Храмов, Е.С.Перескокова, Н.К.Фурсова

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

В статье описан предложенный авторами алгоритм разработки латексных диагностикумов для быстрой идентификации бактериальных патогенов. С использованием предложенного алгоритма получены и охарактеризованы две латексные тест-системы для идентификации возбудителя легионеллеза *Legionella pneumophila* серотип 1 и возбудителей гнойных бактериальных менингитов *Haemophilus influenzae* тип b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* типы A, B, C и W135. Разработанные латексные тест-системы обладают 100%-й чувствительностью и специфичностью 96,5–98,5%. Обе тест-системы зарегистрированы в Российской Федерации и успешно используются в лабораторной диагностической практике.

Ключевые слова: алгоритм, латексные частицы, сенсибилизация, пептидная связь, стрептавидин-биотиновая связь, латексный диагностикум, чувствительность, специфичность

Для цитирования: Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Мицевич И.П., Храмов М.В., Перескокова Е.С., Фурсова Н.К. Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 1). Бактериология. 2023; 8(2): 8–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-8-19

The algorithm for the development and characterization of diagnostic latex test-systems produced at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 1)

E.A.Svetoch, B.V.Eruslanov, I.P.Mitsevich, M.V.Khramov, E.S.Pereskokova, N.K.Fursova

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

The algorithm for the development of latex test-systems for rapid identification of bacterial pathogens is described in the paper. We present two latex test-systems: (1) for identification of *Legionella pneumophila* serotype 1, a causative agent of legionellosis, and (2) for identification of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* types A, B, C, and W135, the causative agents of purulent meningitiS. These latex test-systems characterized in 100% sensitivity and 96.5–98.5% specificity. Both test-systems were registered in the Russian Federation, they are successfully used in the laboratory practice.

Key words: algorithm, latex particles, sensitization, peptide binding, streptavidin-biotin binding, latex test-system, sensitivity, specificity

For citation: Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Mitsevich I.P., Khramov M.V., Pereskokova E.S., Fursova N.K. The algorithm for the development and characterization of diagnostic latex test-systems produced at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 1). Bacteriology. 2023; 8(2): 8–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-8-19

Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, 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, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (496) 360-079
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 24.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (496) 360-079
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 24.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

Диагностические латексные тест-системы, наряду с современными иммунохимическими, иммуноферментными и молекулярно-генетическими и другими методами, в настоящее время широко используются в диагностике инфекционных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. На сегодняшний день известны два типа латексных диагностикумов: антительные и антигенные. Первые применяются для идентификации патогенных бактерий и грибов, вторые – для серологической диагностики бактериальных, вирусных и грибковых инфекций, а также заболеваний, вызываемых простейшими [1]. Латексные тест-системы используют также в диагностике неинфекционных заболеваний [2].

Значительное внимание и интерес специалистов к реакции латекс-агглютинации (РЛА), выполняемой на стекле, объясняется рядом ее преимуществ перед другими методами диагностики: простота постановки, быстрое получение результатов (в течение нескольких минут), отсутствие необходимости специального оборудования и возможность проведения в различных, в т.ч. полевых, условиях. РЛА обеспечивает хорошую визуализацию результата взаимодействия (склеивания) специфичных антител и корпускулярных антигенов, что позволяет сделать заключение о реакции (положительная или отрицательная), не прибегая к оценке реакции «в крестах», как это принято при учете результатов обычной реакции агглютинации (РА). Помимо указанных выше преимуществ, современные латексные тест-системы характеризуются высокими показателями чувствительности и специфичности (94–100%), что делает их весьма привлекательными и востребованными лабораторными специалистами. Важно также отметить, что для приготовления латексных диагностикумов расходуется существенно меньшее количество специфичных сывороток (иммуноглобулинов), чем при производстве диагностических агглютинирующих сывороток.

Производством латексных диагностикумов в настоящее время занимаются многие зарубежные фирмы, в том числе Oxoid (Великобритания), Hardy diagnostics (США), Microgen Bioproducts Ltd. (Великобритания), BioMerieux (Франция) и HiMedia (Индия). Как правило, в перечень производимых фирмами латексных тест-систем входят диагностикумы для идентификации наиболее часто встречающихся в инфекционной патологии бактериальных возбудителей, таких как *Haemophilus influenzae* тип b, *Neisseria meningitidis* типы A, B, C и W135, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* серотипа 1 и серотипов 1–15, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* и *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., в том числе MRSA, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Treponema pallidum* и др. [3]. Антигенные латексные тест-системы, производимые фирмами, предназначены для серодиагностики инфекций, вызываемых *Leptospira interrogans* (лептоспироз), вирусом *Rubella* (краснуха), *Rotavirus* (энтерит), вирусом Эпштейна–Барр (мононуклеоз), грибами *Criptococcus* (криптококкоз), простейшими вида *Toxoplasma* (токсоплазмоз) и др. [4, 5]. Производят и широко используют в медицинской практике латексные диагностикумы также для выявления неинфекционных патологий, например для определения в крови С-реактивного белка, хорионного гонадотропина, ревматоидного фактора, определения групп крови и других целей [6].

В Российской Федерации производство диагностических латексных тест-систем для идентификации патогенов и серодиагностики инфекционных заболеваний пока развито слабо. На сегодняшний день на российском рынке представлены латексные тест-системы фирм ЗАО «Эколаб» (https://ekolab.ru/catalog/), «Vital ГК Вектор» (gkvector.com), Syntest (syntest.ru/catalog), «ДонЛаб» (donlab.ru/catalog/lateksnye_test_sistemy_1), НПО «РЕНАМ» (http://www.renam.ru/d-dimery), ФБУН «ГНЦ ПМБ» (https://obolensk.org/services/nutrient-media/diagnostics/chapters/tests).

Реакция латекс-агглютинации

РЛА является одним из вариантов обычной РА, в которой взаимодействуют два компонента – специфичные антитела и корпускулярные антигены. Это взаимодействие при постановке РЛА на стекле проявляется образованием мелких, видимых невооруженным глазом крупинок (агглютината). Впервые феномен склеивания (агглютинации) бактерий сывороткой крови животных был описан Chorrin & Kader в 1890 г., а агглютинация бактерий как специфическая реакция иммунной системы макроорганизма на патоген была продемонстрирована Gruber & Durchan в 1896 г. [7]. В этом же году Widal предложил использовать реакцию агглютинации в качестве диагностического теста при брюшном тифе [8]. В последующие годы были разработаны и стали применяться в лабораторной практике различные варианты РА: классическая пробирочная, пластинчатая (на стекле), реакции гемагглютинации и коагглютинации и др. В реакциях гемагглютинации и коагглютинации, в отличие от обычной РА, включены дополнительные компоненты – обработанные формалином эритроциты, способные иммобилизовать на своей поверхности антитела или антигены и убитые клетки специальных белок А-образующих штаммов *Staphylococcus aureus*, связывающие на своей поверхности антитела. Использование эритроцитов и клеток *S. aureus* существенно улучшило визуализацию результатов реакций и позволило повысить степень стандартизации их постановки. Недостатками эритроцитарных диагностикумов были их нестабильность и сравнительно небольшие сроки хранения [8].

В РЛА на стекле вместо эритроцитов и клеток стафилококков используют специальные, химически синтезированные, полистирольные инертные стандартизованные микросферы (латексные частицы) размером от 0,1 до 2 мкм (рис. 1), на поверхности которых иммобилизованы функционально активные химические группы (карбоксильные, аминные, альдегидные, стрептоавидиновые и др.), способные связываться с антителами (антительные диагностикумы) или антигенами (антигенные диагностикумы).

Использование в РЛА стандартизованных активированных латексных частиц позволило кардинально улучшить два основных свойства диагностикумов – показатели чувствительности и специфичности, которые у современных латексных тест-систем сопоставимы с аналогичными показателями других диагностикумов и составляют 94–100%. Латексные диагностикумы сохраняют свою стабильность и активность в течение года и более. Высокая чувствительность и специфичность латексных диагностикумов, их стабильность при

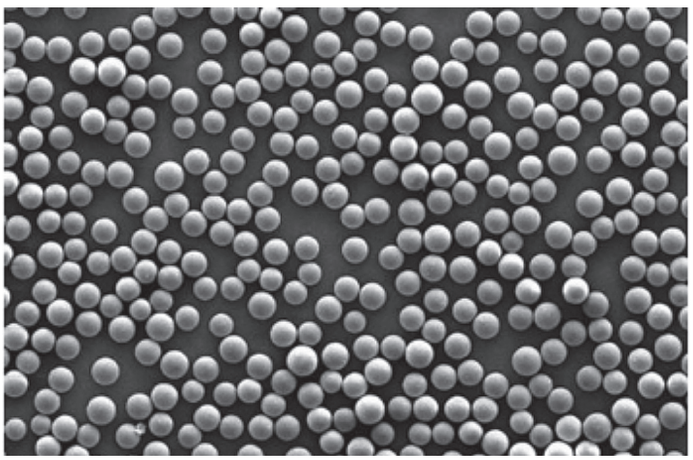


Рис. 1. **Полистирольные стандартизованные микросферы – латексные частицы (https://www.sekisui.co.jp/search/detail-3499.html).**
Fig. 1. ***Polystyrene standardized microspheres – latex parts (https://www.sekisui.co.jp/search/detail-3499.html).***

длительном хранении, простота постановки реакции являются основной причиной появления на мировом рынке большой палитры латексных диагностикумов для идентификации микроорганизмов, в т.ч. патогенных, а также для серологической диагностики инфекционных заболеваний.

Алгоритм разработки антительных латексных диагностикумов

Используемая нами в работе схема получения антительных латексных диагностикумов для идентификации бактериальных патогенов включает в себя следующие основные этапы: 1) выбор антигена-мишени, специфичного соответственно для рода, вида или серотипа тестируемого бактериального патогена; 2) выделение, очистка и характеристика антигена-мишени; 3) получение кроличьих поливалентных иммуноглобулинов G, специфичных к выбранному антигену-мишени; 4) сенсибилизация активированных карбоксильными или стрептавидиновыми функциональными группами латексных частиц специфическими IgG-антителами; 5) испытание чувствительности и специфичности приготовленных латексных диагностикумов.

Выбор антигена-мишени у бактериального патогена зависит от назначения разрабатываемого диагностикума: будет ли он использован для идентификации принадлежности патогена к роду, виду или определенному серотипу (серогруппе). Во всех случаях выбранные антигены-мишени будут различаться между собой. Как правило, в качестве антигенов выступают белки внешней мембраны, липополисахариды (ЛПС) и полисахариды микроба как наиболее специфичные компоненты бактериальной клетки. При конструировании диагностикумов, помимо белков и ЛПС, мы использовали капсульные полисахариды грамположительных бактерий, в частности возбудителей бактериальных гнойных менингитов.

Этап выделения и очистки образца специфического антигена-мишени включает в себя выделение из бактериальной суспензии патогена препарата наружных мембран и последующую экстракцию из них специфичных белков, О-антигенов (полисахаридов ЛПС) или капсульных полисахаридов. Очистку специфических антигенов-мишеней осуществляли хроматографическими методами. У выделенных антигенов определяли чистоту в ПААГ-электрофорезе, а специфичность – в реакции диффузионной преципитации и иммуноблоте с референс-специфическими иммуноглобулинами к целевым антигенам-мишеням. Поливалентные высокотитражные сыворотки получали многократной иммунизацией кроликов (подкожно и/или внутривенно) инактивированной (температурой или фенолом) суспензией целевого микроба. Общая схема выделения целевого антигена-мишени и получения специфических к нему иммуноглобулинов G представлена на рис. 2.

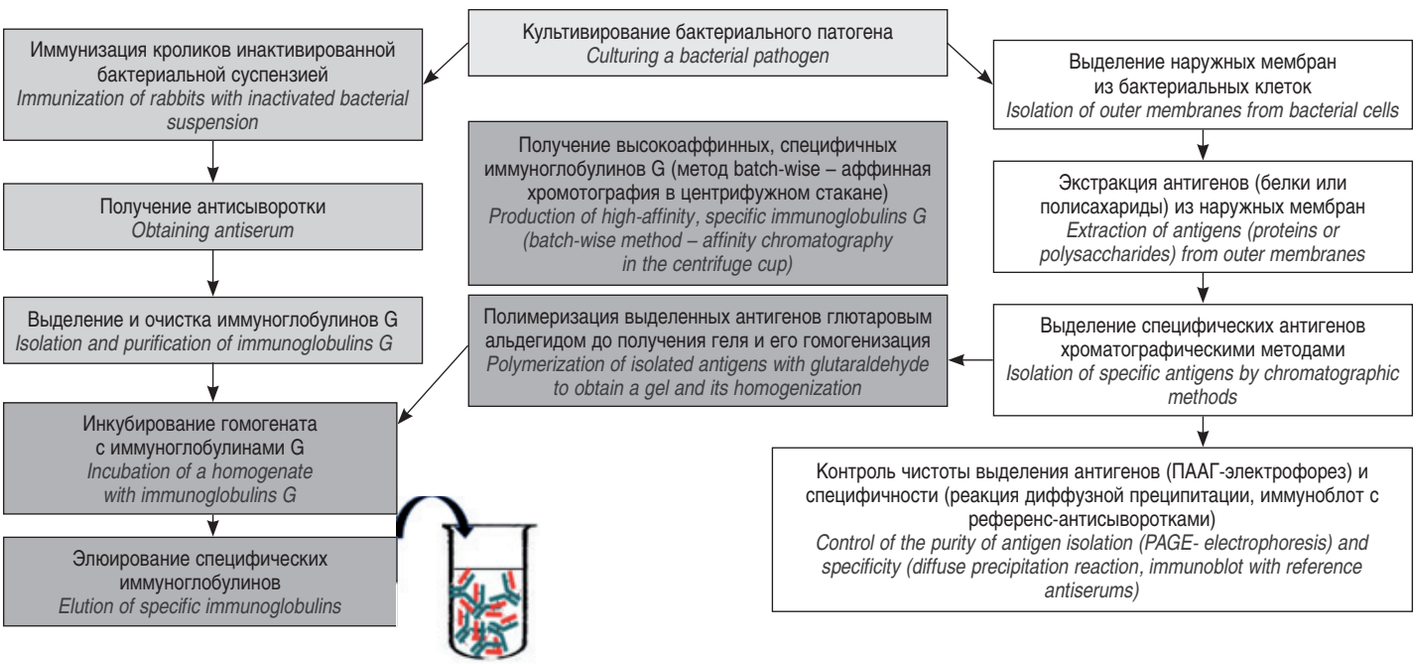


Рис. 2. **Схема получения высокоаффинных специфических иммуноглобулинов G.**
Fig. 2. ***Scheme for the production of high-affinity specific immunoglobulins G.***

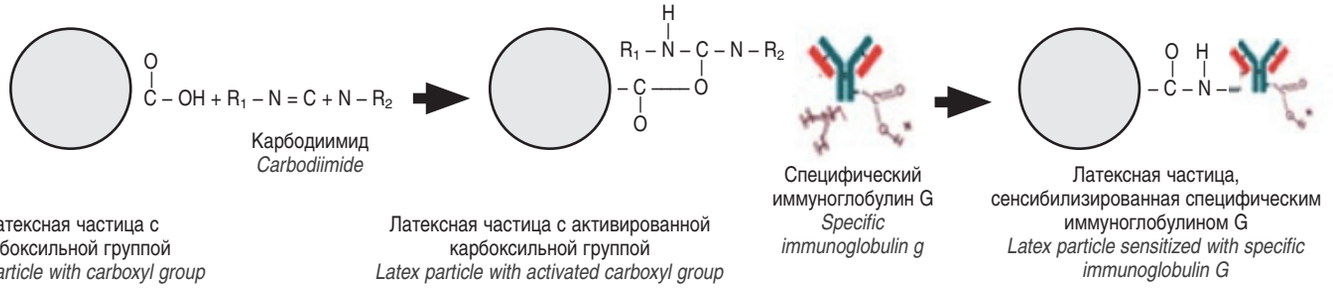


Рис. 3. **Сенсибилизация латексных частиц IgG-антителами через пептидную связь.**
Fig. 3. ***Sensitization of latex IgG parts by antibodies through the peptide bond.***

Процесс сенсибилизации, т.е. химического связывания специфических IgG антител с поверхностью латексных частиц, мы осуществляли двумя путями: через пептидную связь или посредством стрептоавидинбиотиновой связи [9, 10]. В первом случае использовали коммерческие латексные частицы размером 0,8 мкм с иммобилизованными на их поверхности карбоксильными группами, которые перед сенсибилизацией латексных частиц активировали обработкой карбодиимидом. Процесс сенсибилизации латексных частиц через пептидную связь представлен на рис. 3.

При приготовлении диагностикумов мы чаще всего используем именно латексные частицы, активированные карбоксильными группами, поскольку они гораздо дешевле, чем латексные частицы, активированные стрептоавидином. Пептидную связь между латексом и антителами целесообразно использовать в том случае, если к целевому антигену-мишени можно получить высокотитражные иммуноглобулины G. Такие иммуноглобулины, как правило, получают тогда, когда в качестве иммуногенов используют ЛПС (О-антигены) грамотрицательных патогенов (эшерихий, легионелл, иерсиний, кампилобактерий, шигелл и др.) или белковые антигены (листерии).

Сенсибилизацию латексных частиц IgG антителами в ряде случаев осуществляли также через стрептавидин-биотиновую связь. Для этой цели использовали коммерческие латексные сферы с иммобилизованными на них функционально активными группами стрептавидина, белка, способного прочно связываться с белком биотином. Биотин, в свою очередь, связывается с Fc-фрагментами молекул иммуноглобулинов, оставляя при этом свободными антигенсвязывающие Fab-фрагменты IgG-антител. Fab-фрагменты антител, иммобилизованных через стрептавидин-биотиновую связь на латексных частицах, обусловливают реагирование их со специфическими антигенными детерминантами патогена, вызывая его агглютинацию. Расположение антител на поверхности латексных частиц Fab-фрагментами наружу увеличивает число их взаимодействий с антигенными эпитопами патогена, тем самым существенно повышая чувствительность диагностикума [10]. Следует отметить, что стрептавидин-биотиновая связь очень прочно удерживает антитела на поверхности латексных частиц. Схема процесса сенсибилизации латексных частиц иммуноглобулинами G через стрептавидин-биотиновую связь представлена на рис. 4.

Поскольку латексные частицы с рекомбинантным стрептавидином стоят гораздо дороже латексных частиц, активированных карбоксильными группами, целесообразно использовать их в том случае, когда получить целевые IgG к

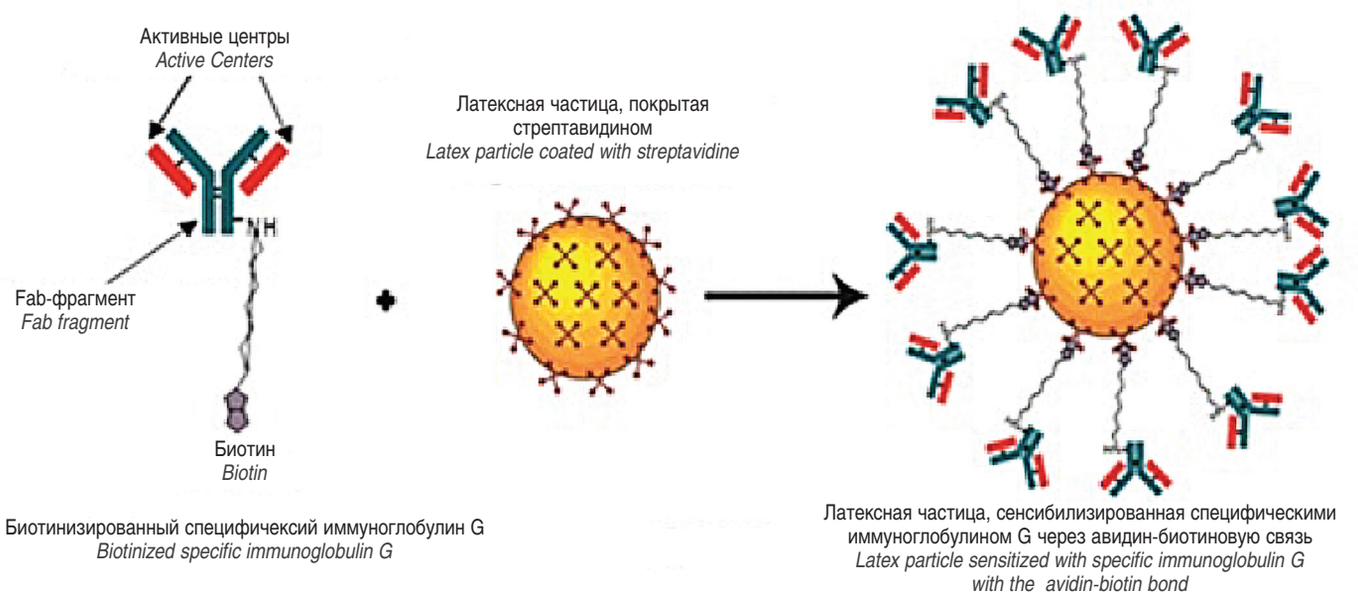


Рис. 4. **Сенсибилизация латексных частиц специфическими иммуноглобулинами G через стрептавидин-биотиновую связь.**
Fig. 4. ***Sensitization of latex particles with specific immunoglobulins G with a streptavidin-biotin bond.***

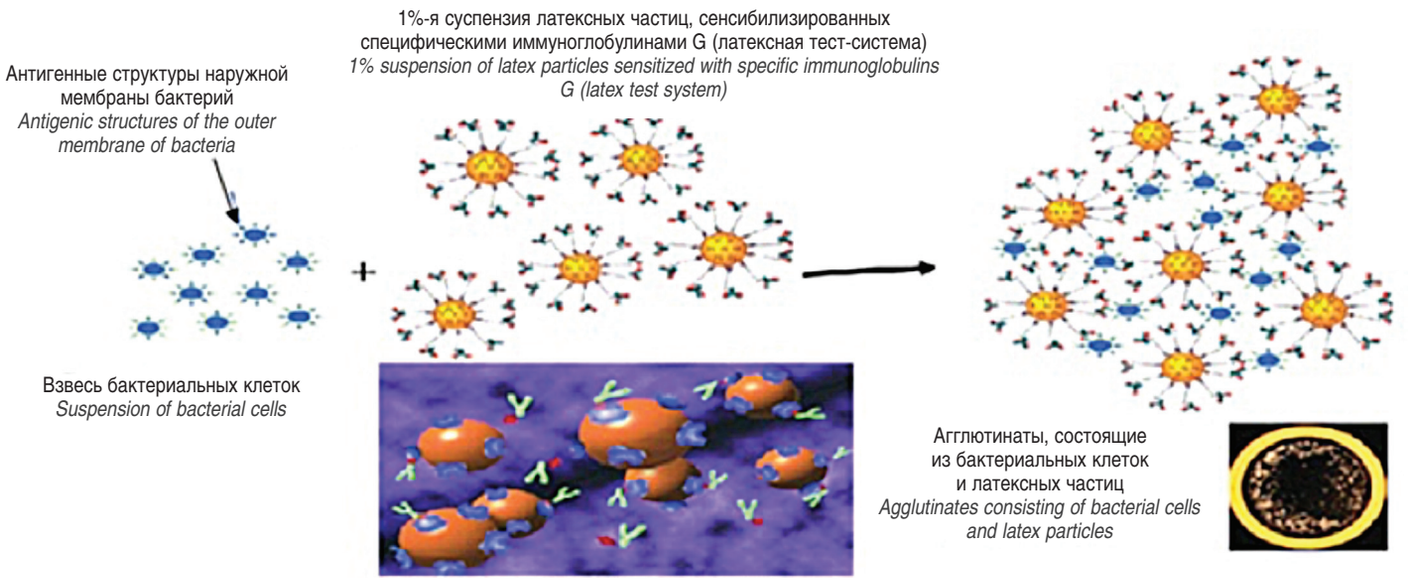


Рис. 5. **Постановка реакции латексной агглютинации.**
Fig. 5. ***Setting the latex agglutination reaction.***

тестируемому антигену в высоком титре не удается. Это, например, справедливо в отношении капсульных полисахаридов возбудителей гнойных бактериальных менингитов, обладающих слабой иммуногенностью.

Описанный выше этап сенсибилизации латексных частиц специфическими к тестируемому патогену IgG, собственно, и является конечной стадией приготовления латексного диагностикума. Далее приготовленный диагностикум проверяют на чувствительность и специфичность.

Чувствительность диагностикума – это выраженный в процентах показатель числа положительных реакций тестируемого диагностикума с различными штаммами целевого патогена, для идентификации которого он предназначен. Например, если латексный диагностикум для идентификации *E. coli* серогруппы O157 дает положительную реакцию с 99 из 100 индикаторных штаммов этой серогруппы, то чувствительность этого диагностикума составляет 99%.

Одновременно с чувствительностью определяют специфичность приготовленного диагностикума. Специфичность латексного диагностикума – это выраженный в процентах показатель числа отрицательных реакций испытуемого диагностикума с клетками близкородственных целевому патогену штаммов бактерий. Например, для оценки специфичности «Латексной тест-системы *E. coli* O157:H7» в качестве индикаторных близкородственных штаммов используют *E. coli* других серогрупп и серотипов, а также культуры *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. и штаммы некоторых других энтеробактерий. Если испытуемый диагностикум дал положительную реакцию латекс-агглютинации с 5 из 100 индикаторных близкородственных бактерий, то его специфичность составляет 95%. В настоящее время, как правило, реализуемые на рынке латексные диагностикумы имеют высокую чувствительность (98–100%) и достаточно высокую специфичность (95–100%). Приготовленный латексный диагностикум не должен содержать бактериальной микрофлоры.

Антительные латексные диагностикумы в лабораторной практике используют для быстрого поиска и идентификации патогена среди колоний, выросших на плотной питательной среде после первичного посева исследуемого материала, а также для оперативного контроля (идентификации) патогенных бактерий при работе в лабораторных условиях. Особенно ценна РЛА при массовом мониторинге возбудителей в пищевых продуктах, объектах внешней среды.

Реакцию латекс-агглютинации ставят на обезжиренных стеклах, смешивая каплю (0,02 мл) высококонцентрированной взвеси (хорошо видимой глазом) испытуемого микроба и каплю (0,02 мл) латексного диагностикума. При положительной РЛА в течение 1–2 мин (максимум 5 мин) можно визуально наблюдать образовавшийся агглютинат. Перед постановкой РЛА диагностикум обязательно проверяют на самоагглютинацию (она должна отсутствовать) и на чувствительность (диагностикум должен давать положительную реакцию с позитивным контрольным штаммом) (рис. 5).

Латексный диагностикум для быстрой идентификации *Legionella pneumophila* серотип 1 (по ТУ9398-78095326-2012, Рег. № РЗН 2013 1278)

Легионеллезная инфекция, вызываемая патогенными легионеллами, диагностируется во многих странах мира, включая Российскую Федерацию. Легионеллез может протекать в двух формах: в форме острой пневмонии, когда у человека поражается нижний отдел легких (болезнь легионеров), и в форме гриппоподобной лихорадки (лихорадка Понтиак). Болезнь легионеров, кроме острой пневмонии, сопровождается лихорадкой, интоксикацией, поражением центральной нервной системы, пищеварительного тракта и почек; иногда у больного может развиться септицемия. Если для лечения легионеллеза не используют эффективные антибиотики, то коэффициент смертности среди больных может достигать 10% и выше [11]. При лихорадки Понтиак легкие не поражаются, исход заболевания благоприятный.

Возбудителем легионеллеза являются широко распространенные в природе бактерии рода *Legionella*, представленного на сегодняшний день 70 видами, из которых только 20 могут вызвать заболевание у человека. Тем не менее, как

показывает клиническая практика, в 90% случаев причиной легионеллеза является только один вид – *L. pneumophila*, насчитывающий в своем составе 16 серогрупп (1–16). Среди этих 16 серогрупп основная роль в этиологии легионеллеза принадлежит серогруппе 1, на долю которой приходится приблизительно 80% всех случаев болезни [12]. Редко легионеллез могут вызывать легионеллы других видов, в частности *L. micdadei*, *L. longbeuchae*, *L. dumoffii*, *L. bozemannii* и некоторые другие [13]. Заражается человек легионеллезом при вдыхании мелкодисперсного аэрозоля или путем аспирации воды, контаминированной патогенными легионеллами. После заражения у 5–10% инфицированных лиц развивается острая пневмония (болезнь легионеров), у 80–95% людей – лихорадка Понтиак [14].

Легионеллы – это грамотрицательные, неспорообразующие прямые или слегка изогнутые палочки длиной от 1 до 20 мкм; они могут образовывать и нитевидные формы, иногда достигающие длины 200 мкм. Свежевыделенные от больных легионеллезом людей культуры легионелл отличаются выраженным полиморфизмом и интенсивным нитеобразованием. Такая вариабельность морфологии клеток через 3–4 пассажа на питательных средах обычно сильно снижается. Жгутики у легионелл, выращенных на питательных средах, отсутствуют, однако они могут образовываться в альвеолах больных людей. Клеточная стенка легионелл, в отличие от других грамотрицательных бактерий, содержит значительное количество фосфолипидов и убихинонов. Количественное соотношение в клеточной стенке жирных кислот и убихинонов используют для идентификации видов Legionella. Большинство видов легионелл имеют схожие культуральные и биохимические свойства. Все известные виды легионелл, за исключением *L. micdadei* и *L. feeleii*, продуцируют β-лактамазу и разжижают желатин. Следует заметить, что все серогруппы *L. pneumophila*, возбудителя легионеллеза, за исключением серогрупп 4 и 15, гидролизуют гиппурат натрия [15]. В противоположность многим бактериям, сбраживающим углеводы, легионеллы в качестве источника энергии и питательных веществ используют аминокислоты. L-цистеин является обязательным компонентом питательных сред для выращивания легионелл. Важными факторами роста легионелл являются также аминокислоты аргинин, изолейцин, лейцин, метионин и ионы железа [16].

К факторам патогенности *L. pneumophila* относят расположенный на поверхности клеточной стенки белок Mip, адгезин с молекулярной массой 24 кДа, видоспецифический белок – порин внешней мембраны, с молекулярной массой 29 кДа и родоспецифический антиген цитоплазматической мембраны [17]. К ферментам патогенности *L. pneumophila* относят Zn-металлопротеазу (цитолизин), фосфолипазу С (легиолизин), а также фосфатазы, липазы и нуклеазы. Важную роль в патогенезе легионеллезной инфекции играют токсины, продуцируемые *L. pneumophila*: термостабильный и термолабильный пептиды, нарушающие процесс фагоцитоза патогена макрофагами и ингибирующие «кислородный взрыв» в макрофагах, а также эндотоксин, вызывающий лихорадку, гипогликемию, нарушение кровоснабжения органов и ацидоз. Важным фактором вирулентности *L. pneumophila* являются белки системы секреции 4-го типа, которые предотвращают слияние фагосомы с лизосомой и формируют репликационную вакуоль для собственного размножения [18].

Для диагностики легионеллеза, вызванного *L. pneumophila*, используют микробиологический метод (выделение и идентификация возбудителя); иммунологические (иммуноферментный анализ, РЛА, иммунохроматографический тест) и молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция в реальном времени). Идентификацию же основного возбудителя легионеллеза *L. pneumophila* серотип 1 проводят с помощью РЛА и иммунохроматографического теста для определения специфического антигена. Из перечисленных методов наиболее простым, быстрым и достаточно информативным является РЛА.

Разработку антительного латексного диагностикума для идентификации *L. pneumophila* серотип 1 проводили в соответствии с предложенным нами алгоритмом. В качестве антигена-мишени был выбран полисахарид (О-антиген) ЛПС *L. pneumophila* серотип 1, определяющий отличие О-антигена серотипа 1 от других 15 серотипов *L. pneumophila* (рис. 6).

Специфические IgG-антитела (титр 1:160–1:320 в реакции диффузионной преципитации) получали шестикратной иммунизацией (попеременное введение антигена внутривенно и/или подкожно) убитой нагреванием взвесью культуры *L. pneumophila* серотип 1. Используя метод batch-wise (см. выше), из сыворотки крови иммунизированных кроликов получали высокоспецифичные (против О-антигена *L. pneumophila* серотип 1) IgG-антитела. Полученными антителами сенсибилизировали латексные частицы, активированные карбоксильными группами, т.е. иммобилизовали антитела на латексных сферах через пептидную связь. Специфичность сенсибилизированных латексных частиц (латексного диагностикума) проверяли на референс-штаммах *L. pneumophila* серотипов 2, 3, 4 и 6, а также на 31 штамме *L. pneumophila* серотипов 2–14 (определенных ранее с помощью латексного диагностикума фирмы Oxoid, Великобритания), выделенных из образцов воды системы горячего водоснабжения 7 городов Российской Федерации, и на штаммах видов *L. micdadei* и *L. longbeuchae*. Ни один из 37 испытанных штаммов легионелл не дал положительной реакции РЛА. Таким образом, полученные результаты говорят о высокой специфичности приготовленного препарата.

Чувствительность диагностикума испытывали на 13 штаммах *L. pneumophila* серотип 1, изолированных из образцов воды систем горячего водоснабжения городов различных регионов России. Все штаммы давали быструю (в течение 1–2 мин) положительную РЛА на стекле.

Диагностикум производится и реализуется ФБУН «ГНЦ ПМБ» медицинским учреждениям уже более 9 лет, ни одной рекламации на качество диагностикума от потребителей не поступало.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации возбудителей гнойных бактериальных менингитов (Латексная тест-система ГБМ) по ТУ 9398-202-78095326-2013, Рег. № РЗН 2014/2268

Бактериальные гнойные менингиты (ГБМ) – группа инфекционных заболеваний нервной системы, характеризующихся развитием общеинфекционного, общемозгового и

менингеального синдромов, а также воспалительными изменениями в цереброспинальной жидкости гнойного характера [19]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется 1 млн случаев ГБМ, из которых 200 тыс. заканчиваются летально [20].

Основными возбудителями ГБМ являются бактерии трех видов: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Реже причиной ГБМ могут быть другие виды микроорганизмов, например *L. monocytogenes*, *E. coli* и *Acinetobacter baumannii*.

N. meningitidis (менингококки) – грамотрицательные, неподвижные, не образующие спор, бобовидной формы диплококки диаметром 0,6–0,8 мкм, относятся к роду *Neisseria*, семейству *Neisseriaceae*. Большинство видов рода являются непатогенными [21]. *N. meningitidis* весьма требовательны к питательным средам: хорошо растут при добавлении в среду крови или сыворотки крови животных. Оптимальная температура для роста патогена – 37°С при содержании в атмосфере 10% CO_2. Через 24 ч роста на кровяном агаре появляются мелкие прозрачные колонии с ровными краями; спустя 2–3 суток колонии увеличиваются в размере и становятся мутными, непрозрачными с неровными краями. Ферментативные свойства *N. meningitidis* относительно слабые: из числа многих углеводов они сбраживают только глюкозу и мальтозу с образованием кислоты без газа. *N. meningitidis* не разжижают желатин, оксидазо- и каталазоположительны. Клеточная стенка нейссерий представлена цитоплазматической мембраной, пептидогликановым слоем, наружной мембраной, содержащей ЛПС и белки. Кроме того, все инвазивные штаммы *N. meningitidis* образуют капсулы полисахаридной природы, являющиеся основными факторами вирулентности менингококков. По химической структуре и антигенным свойствам капсульных полисахаридов *N. meningitidis* подразделяются на 13 серогрупп: A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, W-135 и 29E. Из перечисленных наибольшее эпидемиологическое и клиническое значение имеют серогруппы A, B, C, W-135, X и Y, на долю которых в настоящее время приходится >90% случаев гнойных менингитов.

Единственным хозяином и резервуаром нейссерий является человек. Место обитания нейссерий – слизистая носоглотки, которую менингококки могут колонизировать в разные периоды жизни человека. Источником *N. meningitidis* для здоровых людей являются больные менингококковой инфекцией и носители патогена. Несмотря на то, что ГБМ чаще всего поражают детей младшего возраста (до 5 лет), число носителей среди них, по крайней мере в странах Западной Европы, относительно невелико, зато число носителей среди лиц юношеского возраста, например в Великобритании, достигает 25–30% [22]. В поясе так называемого «африканского менингита» частота носительства наиболее высока – 5% у детей в возрасте 5–14 лет [23]. Носительство инвазивных клонов нейссерий у лиц с еще неразвитой иммунной системой (у детей до одного года), а также у лиц с иммунодефицитом является опасным предрасполагающим фактором для развития ГБМ. Использование вакцины против ГБМ существенно профилактирует носительство возбудителя у людей и заболеваемость ГБМ. Системную менингококковую инфекцию и ГБМ регистрируют как в виде спорадических случаев, так и вспышечных случаев.

Человек заражается инвазивными *N. meningitidis* аэрогенным путем или при тесном контакте с больным менингококковой инфекцией. Попав на слизистую оболочку носоглотки,

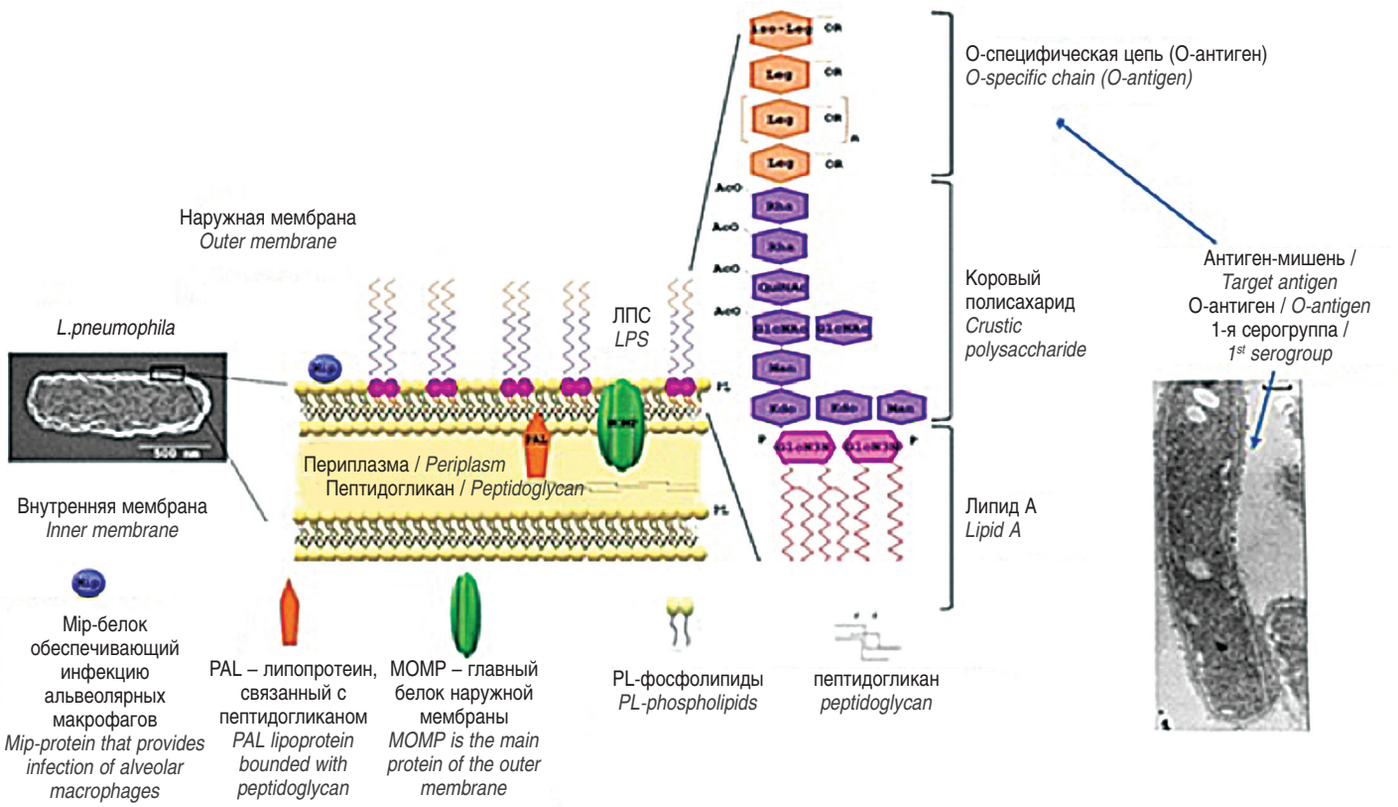


Рис. 6. **Антигенная структура внешней мембраны *L. pneumophila*.**
Fig. 6. ***Antigenic structure of the outer membrane of L. pneumophila.***

патоген колонизирует ее и, при условии высокой вирулентности и сниженного иммунного статуса человека, может проникнуть в кровяное русло и вызвать либо тяжелую системную менингококковую инфекцию, либо бактериемию, поражая отдельные органы. Если *N. meningitidis* преодолевают гематоэнцефалический барьер, то они способны вызвать менингит – поражение мягких оболочек головного и спинного мозга. Возбудитель способен размножаться в спинномозговой жидкости, накапливаться в ней, изменяя ее цвет и вязкость (гнойное воспаление).

Основными возбудителями ГБМ, как указано выше, являются менингококки серогрупп A, B, C, W-135, X и Y, однако этиологическая структура инвазивных ГБМ может существенно отличаться в разных странах. Это во многом зависит не столько от географического расположения страны, сколько от типа (антигенной структуры) используемых в стране конъюгативных вакцин против ГБМ. По мнению ряда авторов, в результате широкого использования вакцин в мире происходит глобальная эволюция в этиологической структуре ГБМ: в ряде стран вместо серогрупп A и C при ГБМ чаще стали выделять менингококки серогрупп B, X, Y и W-135. Поэтому так важно проводить идентификацию серогрупп *N. meningitidis*, поскольку от этого зависит научно обоснованное создание эффективных антименингококковых вакцин [24].

S. pneumoniae – грамположительные бактерии, нередко встречающиеся в микробиоте слизистой верхних дыхательных путей человека, единственного «хозяина» пневмококков. Основным резервуаром и источником *S. pneumoniae* являются дети в возрасте до 5 лет. Носительство пневмококков у детей может продолжаться от нескольких недель до 3–5 мес. Во время носительства у детей формируется специфический иммунитет (в ответ на капсульные полисахариды и белки патогена), в результате чего происходит элиминация *S. pneumoniae* из организма ребенка. Однако в ряде случаев у детей, под влиянием различных внутренних и внешних неблагоприятных факторов, *S. pneumoniae* может вызвать клинически выраженные заболевания. Инфекции, обусловленные пневмококками, принято делить на поверхностные (мукозальные), к которым относятся, например, острый средний отит, и тяжелые инвазивные формы пневмококковой инфекции, такие как пневмония, сепсис и менингит. Чаще всего пневмококковая инфекция поражает детей и пожилых людей, страдающих хроническими заболеваниями, а также иммунокомпрометированных пациентов. Передаются *S. pneumoniae* от человека человеку воздушно-капельным или контактным путем (через инфицированные руки), редко через употребление пищи. По некоторым оценкам, ежегодно в мире только среди детей до 5 лет регистрируется свыше 14 млн тяжелых случаев пневмококковой инфекции, из них приблизительно 800 тыс. заканчиваются летально [25].

S. pneumoniae – кокки овоидной или ланцетовидной формы диаметром около 1 мкм. В мазках из клинического материала они располагаются попарно (диплококки), окружены мощной капсулой, являющейся основным фактором вирулентности пневмококков (бескапсульные варианты авирулентны для мышей). Капсула защищает патоген от фагоцитоза и от действия комплемента. *S. pneumoniae* хорошо растут на средах с кровью или сывороткой крови, образуя на сывороточном агаре мелкие полупрозрачные колонии округлой формы диаметром около 1 мм; колонии никогда не сливаются между собой. На кровяном агаре вокруг колоний видна зеленоватая зона гемолиза, вызванная α-гемолизином. Пневмококки, в отличие от зеленящих стрептококков, чувствительны к оптохину – веществу, задерживающему рост практически 100% клинических изолятов. Патоген также чувствителен к солям желчных кислот, но, в отличие от зеленящих стрептококков, сбраживает инулин. Основные компоненты клеточной стенки пневмококков – цитоплазматическая мембрана, пептидогликановый слой, тейхоевые кислоты и связанные с ними белки. Следует особо отметить, что находящаяся в составе клеточной стенки тейхоевая кислота содержит фосфорил-холиновую часть и С-полисахарид, которые вместе образуют видоспецифический антиген, т.е. общий антиген для представителей вида *S. pneumoniae*. Этот комплексный антиген быть может использован в качестве антигена-мишени для получения видоспецифических анти-*S. pneumoniae* диагностических антител. Кроме того, в клеточной стенке имеется несколько холин-связанных белков, нековалентно соединенных с холиновой частью тейхоевой кислоты и также обладающих свойствами видоспецифических антигенов. Среди этих белков преобладают белки PspC и PspA. Входящая в состав клеточной стенки липотейхоевая кислота обладает свойствами антигена Форсмана, общего для бактерий и млекопитающих [26].

Штаммы *S. pneumoniae*, выделяемые от людей, весьма гетерогенны по составу и антигенной структуре их капсульных полисахаридов. В настоящее время известно 93 капсульных серотипа, однако роль их в патологии далеко не одинакова. Наиболее частыми возбудителями пневмококковых инфекций во многих странах в период с 1980 по 2007 г. являлись серотипы 1, 5, 6A, 6B, 14, 19F и 23F, а самым распространенным среди них был серотип 14. Следует, однако, заметить, что серотиповый пейзаж *S. pneumoniae* в разных географических зонах может сильно различаться. Например, в Санкт-Петербурге в период с 2010 по 2015 г. превалировали 4 серотипа: 19F, 23F, 3 и 6. В Смоленской области в период с 2006 по 2018 г. возбудителями стрептококкового менингита были серотипы 6A/B, 3, 19F,14,9VA и 23F. Показано, что разнообразие серотипового пейзажа *S. pneumoniae* зависит не только от географического региона, но также и от масштаба применения противопневмококковых вакцин. В настоящее время во многих странах мира для профилактики инвазивных пневмококковых инфекций, а также носительства *S. pneumoniae* с успехом применяют 7-, 10- и 13-валентные полисахаридные конъюгированные вакцины, которые содержат разное количество специфических капсульных полисахаридов. Показано, что вакцинация населения указанными препаратами постепенно приводит к элиминации тех серотипов *S. pneumoniae*, полисахариды которых входят в вакцину. Поэтому так важно для контроля за эпидемиологической ситуацией по пневмококковым инфекциям, включая ГБМ, проводить выделение от больных пациентов и детей-носителей культуры *S. pneumoniae* с последующим их серотипированием [27].

H. influenzae тип b до настоящего времени остается основным этиологическим агентом тяжелых форм гемофильной инфекции у младенцев и детей до 5-летнего возраста –

острой пневмонии и гнойного менингита, которые сопровождаются высокой смертностью [28]. Особенно *H. influenzae* тип b-инфекция (Hib-инфекция) актуальна для развивающихся стран, где вакцинацией против *H. influenzae* тип b охвачена лишь незначительная часть детей в возрасте до 5 лет. В тех же странах, где для профилактики Hib-инфекции используют конъюгированную вакцину (США и страны Европейского союза), роль *H. influenzae* в структуре пневмоний и гнойных менингитов резко сократилась, например, в США с 45–48% (до применения вакцины) до 7% (после начала ее применения в 1990-е гг.) [28]. Важно отметить, что в США и странах Европейского союза гемофильную инфекцию, вызванную *H. influenzae* тип b, стали чаще диагностировать у взрослого населения. В Российской Федерации конъюгированную вакцину против Hib-инфекции пока не производят, охват детей вакцинацией против Hib-инфекции, производимый импортными препаратами, незначительный, вследствие чего случаи этой инфекции, в т.ч. и гнойного менингита, среди детей продолжают регистрироваться [29].

H. influenzae тип b относятся к роду *Haemophilus*, семейству *Pasteurellacea*, представляет собой мелкие грамотрицательные неподвижные палочки овоидной (кокковидной) формы, окруженные полисахаридной капсулой, спор не образуют. Бактерии относятся к факультативным анаэробам. *H. influenzae* являются мезофилами – оптимальная для их роста температура составляет 35–37°С. Патоген весьма требователен к питательным средам: для своего роста *in vitro* он требует обязательной добавки двух субстанций: X (гемин) и V (никотинамидадениндинуклеотид (НАД)), которые сам микроб не синтезирует. Традиционно для выделения и выращивания *H. influenzae* тип b используют шоколадный агар, который получают добавлением 5–10% дефибринированной крови к основе кровяного агара. Смесь прогревают при 80°С в течение 15–20 мин для высвобождения НАД из эритроцитов крови, а также для инактивации НАД-разрушающих ферментов. При росте на шоколадном агаре *H. influenzae* тип b образует большие, выпуклые, сероватые непрозрачные колонии. При использовании шоколадного агара для выделения *H. influenzae* тип b важно учитывать, что на этой среде могут вырастать и другие виды рода *Haemophilus* [30].

Для идентификации возбудителей гнойных бактериальных менингитов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* используют все современные методы диагностики: микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические и физико-химические, времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS) [30]. Однако во всех случаях диагностики ГБМ важно выделить от больного чистую культуру возбудителя. Это необходимо для его идентификации, определения чувствительности к антимикробным препаратам и назначения эффективного лечения больного. Выделение культуры необходимо и для определения серотиповой принадлежности патогена (с целью оптимального антигенного состава разрабатываемых вакцин против *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*). Это также важно для генотипирования выделяемых культур с целью выявления эпидемически значимых генетических линий возбудителей ГБМ.

Важное место в экстренной диагностике ГБМ отводится РЛА, которая позволяет, в случае наличия возбудителя в спинномозговой жидкости, в течение 15–20 мин идентифицировать принадлежность его к виду (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* или *H. influenzae* тип b) и сразу назначить эмпирическую антимикробную терапию. РЛА является эффективным инструментом для поиска и идентификации колоний возбудителей, выросших на специальных средах после первичного высева исследуемого материала [31]. Следует, однако, учитывать, что в том случае, когда до исследования спинномозговой жидкости больного лечили эффективными антибиотиками, возбудитель в спинномозговой жидкости может и не обнаруживаться в РЛА.

При разработке латексных диагностикумов для идентификации возбудителей ГБМ – *N. meningitidis* типов A, B, C и W-135, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b – использовали тот же алгоритм, что и при разработке описанных выше диа-

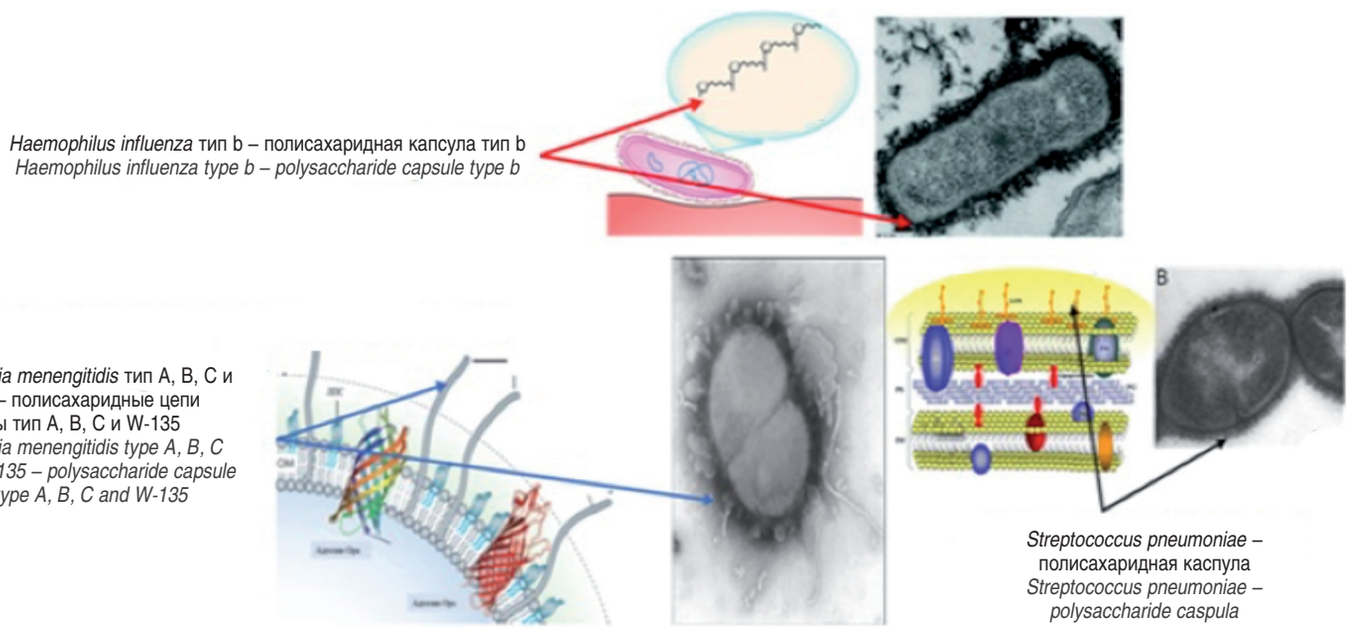


Рис. 7. **Антигены-мишени возбудителей гнойных бактериальных менингитов.**
Fig. 7. ***Target antigens of pathogens of purulent bacterial meningitis.***

гностикумов: выбор мишени, выделение и очистка препарата антигена-мишени, получение специфических IgG-антител, сенсибилизация латексных частиц, проверка чувствительности и специфичности полученных диагностикумов. В качестве антигенов-мишеней для *N. meningitidis* были выбраны капсульные полисахариды типов A, B, C и W-135, для *S. pneumoniae* – видоспецифический комплексный антиген клеточной стенки, состоящий из фосфорил-холиновой части и С-полисахарида тейхоевой кислоты, для *H. influenzae* тип b – типоспецифический капсульный полисахарид (рис. 7).

Специфические IgG-антитела к антигенам-мишеням получали с помощью 6–8-кратной иммунизации кроликов инактивированными температурой препаратами соответствующих штаммов-продуцентов антигенов-мишеней. Весьма важно, чтобы культура иммунизирующего штамма имела хорошо выраженные капсулы, что достигается выращиванием штамма-продуцента на кровяных питательных средах. Поскольку специфические полисахариды обладают слабой иммуногенностью, получить препараты IgG-антител в высоком титре не удается. Как правило, титры IgG-антител к антигенам возбудителей ГБМ составляют не более 1:16–1:32. В связи с невысокой концентрацией получаемых IgG-антител для сенсибилизации латексных частиц IgG-антителами мы использовали стрептоавидин-биотиновую связь, которая обеспечивает прочную связь Fc-фрагмента антител с латексной сферой, оставляя свободными антигенсвязывающие Fab-фрагменты, что существенно повышает чувствительность латексного диагностикума.

Рис. 8. **Фото и регистрационные удостоверения латексных тест-систем для идентификации *L. pneumophila* серотип 1 и возбудителей гнойных бактериальных менингитов *N. meningitidis* типов A, B, C и W-135; *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b.**
Fig. 8. ***Photo and registration certificates of latex test systems for the identification of L. pneumophila serotype 1 and pathogens of purulent bacterial meningitis N. meningitidis types A, B, C and W-135; S. pneumoniae and H. influenzae type b.***

Таким образом, для идентификации основных возбудителей ГБМ было разработано 6 отдельных латексных диагностикумов: 4 для определения A, B, C и W-135 типов *N. meningitidis* и 2 для идентификации *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b. Чувствительность приготовленных диагностикумов была проверена на штаммах *N. meningitidis* (n = 14), *S. pneumoniae* (n = 50) и *H. influenzae* тип b (n = 9). Все использованные индикаторные культуры дали положительную реакцию в латекс-агглютинации с соответствующими диагностикумами, то есть чувствительность разработанных диагностикумов была равной 100%. Специфичность латексных диагностикумов для идентификации A, B, C и W-135 типов *N. meningitidis* составляла 100%, для идентификации *S. pneumoniae* – 95%, для идентификации *H. influenzae* тип b – 96%.

Заключение

Предложенный нами алгоритм разработки антительных латексных диагностикумов, включающий в себя этапы выбора антигена-мишени, получения поливалентных специфических IgG-антител к выбранным антигенам, сенсибилизации специфическими IgG-антителами латексных частиц, позволяет получать высокочувствительные и высокоспецифичные латексные диагностикумы для быстрой идентификации бактериальных патогенов. С использованием предложенного алгоритма были разработаны две латексные тест-системы: для идентификации *L. pneumophila* серотип 1 и возбудителей гнойных бактериальных менингитов *N. meningitidis* типов A, B, C и W-135, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b. Обе тест-системы зарегистрированы в Российской Федерации и используются в лабораторной диагностической практике (рис. 8).

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 / References

1. Старовойтова А, Стериополо НА, Зайко ВВ, Венгеров ЮЮ. Латексная агглютинация с видеоцифровой регистрацией: повышение диагностической значимости традиционного метода. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;2:7-13. / Starovoitova A, Steriololo NA, Zaiko VV, Vengerov YuYu. Latex agglutination with video-digital registration: increasing diagnostic significance of the traditional method. Clinical Laboratory Diagnostics. 2012;2:7-13. DOI: 616-078.33:681 (In Russian).
2. Максимова ЖВ, Максимов ДМ. Скрининг: современный взгляд на раннюю диагностику и профилактику хронических неинфекционных заболеваний. Архив внутренней медицины. 2014;6(20):36-46. / Maksimova JV, Maksimov

DM. Screening: a modern view on early diagnosis and prevention of chronic non-infectious diseases. Archives of Internal Medicine. 2014;6(20):36-46. DOI: 10.20514/2226-6704-2014-0-6-52-57 52 -56 (In Russian).

3. Diallo K, Feteh VF, Ibe L, Antonio M, Caugant DA, du Plessis M, et al. Molecular diagnostic assays for the detection of common bacterial meningitis pathogens: A narrative review. EBioMedicine. 2021 Mar;65:103274. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103274
4. Balamurugan V, Thirumalesh SRA, Alamuri A, SowjanyaKumari S, Vinod Kumar K, Linshamol L, et al. Evaluation of the diagnostic potential of recombinant leptospiral OMP A-like protein (Loa22) and transmembrane (OmpL37) protein in latex agglutination test for serodiagnosis of leptospirosis in animals. Lett Appl Microbiol. 2021 Jun;72(6):730-740. DOI: 10.1111/lam.13461
5. Trovero AC, Mazza M, Rogé A, Rivas MC, Bordagorría X, Bruno S, et al. Production of a latex agglutination reagent for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis. Rev Argent Microbiol. 2020 Jul-Sep;52(3):169-175. DOI: 10.1016/j.ram.2019.06.002
6. Drew P. Infectious and tropical diseases. Oxford handbook of clinical and laboratory investigation (4 ed). 2018:381-434 DOI: 10.1093/med/9780198766537.003.0005
7. Bergwerff AA, Debast SB. Modernization of Control of Pathogenic Micro-Organisms in the Food-Chain Requires a Durable Role for Immunoaffinity-Based Detection Methodology – A Review. Foods. 2021 Apr 11;10(4):832. DOI: 10.3390/foods10040832
8. Мамедов МК. Иммунохимия: вековой путь от реакции агглютинации до лигандного иммуноанализа. Биомедицина. 2007;3:35-47. / Mamedov MK. Immunochemistry: a century's journey from agglutination reaction to ligand immunoassay. Biomedicine. 2007;3:35-47. (In Russian).
9. Inzana TJ. Simplified procedure for preparation of sensitized latex particles to detect capsular polysaccharides: application to typing and diagnosis of Actinobacillus pleuropneumoniae. J Clin Microbiol. 1995 Sep;33(9):2297-303. DOI: 10.1128/jcm.33.9.2297-2303.1995
10. Chen T, Hedman L, Mattila PS, Jartti L, Jartti T, Ruuskanen O, et al. Biotin IgM antibodies in human blood: a previously unknown factor eliciting false results in biotinylation-based immunoassays. PLoS One. 2012;7(8):e42376. DOI: 10.1371/journal.pone.0042376
11. Ерусланов БВ, Светоч ЭА, Мицевич ИП. Легионеллез и его лабораторная диагностика. Бактериология. 2018;3(3):58-67. / Yeruslanov BV, Svetoch EA, Mitsevich IP. Legionellosis and its laboratory diagnosis. Bacteriology. 2018;3(3):58–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-58-67 (In Russian).
12. Kanarek P, Bogiel T, Breza-Boruta B. Legionellosis risk – an overview of *Legionella* spp. habitats in Europe. Environ Sci Pollut Res Int. 2022 Nov;29(51):76532-76542. DOI: 10.1007/s11356-022-22950-9
13. Izquierdo E, Gil-de-Miguel Á, Rodríguez-Caravaca G. *Legionella pneumophila* Risk from Air-Water Cooling Units Regarding Pipe Material and Type of Water. Microorganisms. 2023 Mar 2;11(3):638. DOI: 10.3390/microorganisms11030638
14. Тартаковский ИС, Адгамов РР, Ермолаева СА, Дронина ЮЕ, Карпова ТИ, Галстян ГМ, и др. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013;15(3):166-172. / Tartakovsky IS, Adgamov RR, Ermolaeva SA, Dronina YuE, Karpova TI, Galstyan GM, et al. Methodological features of diagnosis of legionellosis pneumonia in medical and preventive institutions. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2013;15(3):166-172. (In Russian).
15. Тартаковский ИС, Галстян ГМ, Карпова ТИ, Катрыш СА, Дронина ЮЕ, Садретдинова ОВ. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012;14(2):100-1066. / Tartakovsky IS, Galstyan GM, Karpova TI, Katrysh SA, Dronina YuE, Sadretdinova OV. Methodological features of diagnosis of legionellosis pneumonia in medical and preventive institutions. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2012;14(2):100-1066. (In Russian).
16. Mondino S, Schmidt S, Rolando M, Escoll P, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. Annu Rev Pathol. 2020 Jan 24;15:439-466. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742
17. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev. 2015 Jan;28(1):95-133. DOI: 10.1128/CMR.00029-14
18. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of Legionella: Intracellular replication and host response. Virulence. 2021 Dec;12(1):1122-1144. DOI: 10.1080/21505594.2021.1903199
19. Матосова СВ, Миронов КО, Платонов АЕ, Шипулина ОЮ, Шипулин ГА, Нагибина МВ, и др. Молекулярно-биологический мониторинг возбудителей гнойного бактериального менингита на современном этапе. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018;7:93-99. / Matosova SV, Mironov KO, Platonov AE, Shipulina OYu, Shipulin GA, Nagibina MV, et al. Molecular and biological monitoring of purulent bacterial meningitis pathogens at the present stage. Infectious Diseases: News, Opinions, Learning. 2018;7:93-99. (In Russian).
20. Оганесян АН, Воропаева ЕА, Мельникова АА, Миронов АЮ, Егорова ЕА, Урбан ЮН, и др. Эффективность методов лабораторной диагностики гнойного бактериального менингита. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(2):117-121. / Oganesyan AN, Voropaeva EA, Mel'nikova AA, Mironov AYu, Egorova EA, Urban YuN, et al. Efficacy of laboratory methods of diagnostic of purulent bacterial meningitis. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019;64(2):117-121. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-2-117-121 (In Russian).
21. Clemence MEA, Maiden MCJ, Harrison OB. Characterization of capsule genes in non-pathogenic *Neisseria* species. Microb Genom. 2018 Sep;4(9):e000208. DOI: 10.1099/mgen.0.000208
22. Masri A, Alassaf A. Recurrent meningitis in children: etiologies, outcome, and lessons to learn. Childs Nerv Syst. 2018;34(8):1541-1547. DOI: 10.1007/s00381-018-3815-9
23. Cooper LV, Kristiansen PA, Christensen H, Karachaliou A, Trotter CL. Meningococcal carriage by age in the African meningitis belt: a systematic review and meta-analysis. Epidemiol Infect. 2019 Jan;147:e228. DOI: 10.1017/S0950268819001134
24. Davis LE. Acute bacterial meningitis. Continuum (Minneap Minn). 2018;24(5, Neuroinfectious Disease):1264-1283. DOI: 10.1212/CON.0000000000000660
25. Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Clin Microbiol Rev. 2011 Jul;24(3):557-91. DOI: 10.1128/CMR.00008-11
26. Chun YY, Tan KS, Yu L, Pang M, Wong MHM, Nakamoto R, et al. Influence of glycan structure on the colonization of *Streptococcus pneumonia* on human respiratory epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Mar 28;120(13):e2213584120. DOI: 10.1073/pnas.2213584120
27. Glanville DG, Gazioglu O, Marra M, Tokars VL, Kushnir T, Habtom M, et al. Pneumococcal capsule expression is controlled through a conserved, distal cis-regulatory element during infection. PLoS Pathog. 2023 Jan 31;19(1):e1011035. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011035
28. Салимова Е, Конон А, Трухин В, Красильников И. Мировые тенденции в изоляции, идентификации и характеристике Haemophilus influenzae тип В – возбудителя гемофильной инфекции. Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2019;1:87-93. / Salimova E, Konon A, Trukhin V, Krasilnikov I. Global trends in isolation, identification, and characterization of Haemophilus influenzae type B, the causative agent of *Haemophilus influenzae* infection. Bulletin of the Russian Academy of Sciences, Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2019;1:87-93. (In Russian).
29. Pinto M, González-Díaz A, Machado MP, Duarte S, Vieira L, Carriço JA, et al. Insights into the population structure and pan-genome of *Haemophilus influenzae*. Infect Genet Evol. 2019 Jan;67:126-135. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.10.025

30. Takeuchi N, Segawa S, Ishiwada N, Ohkusu M, Tsuchida S, Satoh M, et al. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Infect Chemother. 2018 Jul;24(7):510-514. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.02.007
31. Kennedy WA, Chang SJ, Purdy K, LE T, Kilgore PE, Kim JS, et al. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. Epidemiol Infect. 2007 Oct;135(7):1217-26. DOI: 10.1017/S0950268806007734

Информация о соавторах:

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

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий 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

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора 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

Information about co-authors:

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Science), Professor, Chief researcher of Antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

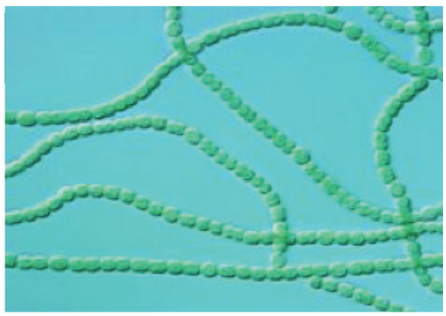
Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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

Mikhail V. Khramov, PhD, MD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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

Использование цианобактерий для преобразования углекислого газа в глюкозу



Глюкоза является наиболее распространенным моносахаридом, служащим важным источником энергии для клеток и важным сырьем для биоперерабатывающей промышленности. Маршрут «растение–биомасса–сахар» доминирует в текущем поступлении глюкозы, в то время как на него влияет множество параметров, таких как циклы выращивания растений, радиус сбора биомассы и затраты на предварительную обработку.

На фоне глобального климатического кризиса и обострения нехватки продовольствия необходима разработка более эффективных, непрерывных и промышленных способов производства глюкозы. Однако прямое превращение углекислого газа в глюкозу посредством естественного процесса фотосинтеза долгое время не совершало прорыва.

Исследовательская группа под руководством профессора Лу Сюэфэна и профессора Луань Годуна из Института биоэнергетики и биопроцессов Циндао (QIBEBT) Китайской академии наук (CAS) определила ключевые факторы, ограничивающие природный потенциал цианобактерий для прямого преобразования CO_2 в глюкозу, и они построили эффективные фотосинтетические клеточные фабрики, синтезирующие глюкозу.

У фотоавтотрофов, например высших растений и водорослей, глюкоза синтезируется как хранилище углерода и энергии. Метаболизм глюкозы имеет сложные взаимодействия с фотосистемами, нарушает синтез и метаболизм пигментов и может даже ингибировать фотосинтетическую активность. Поэтому свободная глюкоза редко синтезируется или накапливается в избытке при фотосинтетическом клеточном метаболизме.

Целенаправленный нокаут двух генов глюкокиназы цианобактерии *Synechococcus elongatus* PCC 7942 нарушал углеводный обмен и активировал метаболический поток к глюкозе через сеть метаболизма сахарозы. Усиление синтеза глюкозы способствовало накоплению специфической спонтанной геномной мутации на хромосоме PCC 7942, что способствует эффективной секреции глюкозы.

Исследователи дополнительно прояснили пути и мутации, ведущие к синтезу и секреции глюкозы, и оптимизировали характеристики синтеза глюкозы у рекомбинантных штаммов. Благодаря последующей метаболической инженерии и оптимизации культивирования глюкоза, секретируемая сконструированным штаммом, превышает 5 г/л при длительном культивировании, что составляет до 70% фиксированного источника углерода.

Эти результаты проливают свет на разработку и промышленное внедрение более направленных и непрерывных систем производства глюкозы с использованием солнечной энергии и углекислого газа.

Zhang S, Sun J, Feng D, et al.
Unlocking the potentials of cyanobacterial photosynthesis for directly converting carbon dioxide into glucose.
Nat Commun. 2023 Jun 9;14(1):3425. DOI: 10.1038/s41467-023-39222-w