

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2023 • ТОМ 8 • №4

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

А.П.Анисимов, д.м.н., проф. (Россия)
С.В.Балахонов, д.м.н., проф. (Россия)
А.Н.Куличенко, академик 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, к.б.н. (Китай)

Редколлегия

З.Адъясурэн, д.м.н., проф. (Монголия)	И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Республика Узбекистан)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
М.И.Буаро, д.м.н., проф. (Гвинейская Республика)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, к.б.н., проф. (США)
Ш.Гурбанов, к.м.н. (Азербайджанская Республика)	Т.В.Припутневич, член-корр. РАН, д.м.н. (Россия)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	А.В.Ракин, к.м.н. (Германия)
Л.В.Домотенко, к.б.н. (Россия)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.б.н., проф. (Великобритания)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
М.Н.Косой, к.б.н. (США)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (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

Журнал входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК,
в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, РИНЦ

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболensk,
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 25.12.2023 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

Значение исследований по распространению факторов патогенности возбудителей болезней человека 5

Экспериментальные статьи

Динамика и клиническая значимость резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибактериальным препаратам
О.Ю.Филимонова, Т.Б.Сафонова, Л.В.Золотарева, Л.А.Любасовская, Т.А.Савинова, В.Ю.Ананьева 7

Конструирование мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии
В.И.Дятлова 14

Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация
В.В.Кузин, Н.В.Колупаева, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, И.А.Дятлов 28

Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ
М.А.Сотникова, К.В.Хлопова, Г.М.Вахрамеева, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов 36

ICEVpaRus – новый ICE-элемент *Vibrio parahaemolyticus*
С.О.Водопьянов, О.С.Чемисова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, М.М.Сагакянц, О.А.Цырулина 42

CRISPR/Cas-белки для выявления генов антибиотикоустойчивости у патогенных микроорганизмов
М.А.Тюменцева, А.И.Тюменцев, А.Н.Преловская, В.Г.Акимкин 47

Современные подходы к диагностике сочетанных очагов туляремии на территории Алтая
Е.Н.Рождественский, Г.Х.Базарова, Е.С.Полковников, Е.Е.Бжитских, Н.Ю.Красавина, А.А.Киреев 51

Влияние низкомолекулярного пептида *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai BKMF-4268D на бактерии рода *Listeria*
А.Ю.Аринбасарова, В.Н.Борзенков, Н.К.Фурсова, А.Г.Меденцев 58

Обзорные статьи

Проблемы диагностики малярии
И.Ю.Щит, П.В.Соловьев, С.Ф.Бикетов 63

Опасные патогены из группы *Bacillus cereus complex*
Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, К.В.Хлопова, Г.М.Титарева, А.Н.Мокриевич, Е.А.Тюрин, И.А.Дятлов 67

Микобактериофаги – вирусы микобактерий
М.В.Фурсов 76

Проблемная статья

Разработка набора сывороток диагностических шигеллезных и освоение его производства
Т.Ю.Гашенко, С.Г.Марданлы 80

Правила оформления статей (основные положения) 85

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS, Sc.D., prof.
(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, academician 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, PhD (China)

Editorial Board

Z.Adyaasyren, Sc.D., prof. (Mongolia)	M.N.Kosoi, PhD (USA)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)	I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
M.Y.Boiro, ScD., prof. (Republic of Guinea)	S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)	T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)	V.L.Motin, PhD, prof. (USA)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)	T.V.Priputnevich, corr.member of RAS, ScD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)	A.V.Rakin, PhD (Germany)
Sh.Gurbanov, PhD (Republic of Azerbaijan)	K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
G.A.Karimova, PhD (France)	I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (Great Britain)	E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)	V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Abstracting journal is indexed in the Russian Science Citation Index

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

The importance of research on the distribution of pathogenicity factors of human diseases 5

Experimental Articles

Dynamics and clinical significance of resistance *Streptococcus pneumoniae* to antibacterial drugs
O.Y.Filimonova, L.A.Lyubasovskaya, T.B.Safonova, L.V.Zolotareva, T.A.Savinova, V.Yu.Ananyeva 7

Construction of multiepitope subunit vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods
V.I.Dyatlova 14

Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation
V.V.Kuzin, N.V.Kolupaeva, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, I.A.Dyatlov 28

Influence of the composition of the nutrient medium on the molecular biological properties
of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG
M.A.Sotnikova, K.V.Khlopova, G.M.Vakhrameeva, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov 36

ICEVpaRus – new ICE element *Vibrio parahaemolyticus*
S.O.Vodopyanov, O.S.Chemisova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, M.M.Sagakyants, O.A.Tsyurulina 42

CRISPR/Cas proteins for detecting antibiotic resistance genes in pathogenic microorganisms
M.A.Tyumentseva, A.I.Tyumentsev, A.N.Prelovskaya, V.G.Akimkin 47

Modern approaches to the diagnosis of combined foci of tularemia in Altai
E.N.Rozhdestvensky, G.Kh.Bazarova, E.S.Polkovnikov, E.E.Bzhitskikh, N.Yu.Krasavina, A.A.Kireev 51

Effect of the low molecular weight peptide isolated from *Trichoderma cf. aureoviride*
Rifai strain BKMf-4268D on *Listeria* spp.
A.Yu.Arinbasarova, V.N.Borzenkov, N.K.Fursova, A.G.Medentsev 58

Review Articles

Problems of malaria diagnostics
I.Yu.Shchit, P.V.Soloviev, S.F.Biketov 63

Dangerous pathogens from the *Bacillus cereus* complex group
L.I.Marinin, N.A.Shishkova, K.V.Khlopova, G.M.Titareva, A.N.Mokrievich, E.A.Tyurin, I.A.Dyatlov 67

Mycobacteriophages are viruses of mycobacteria
M.V.Fursov 76

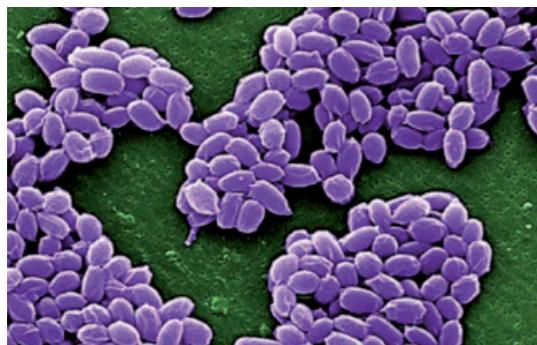
Problem-solving Article

Development of a set of diagnostic shigellosis serums and mastering its production
T.Yu.Gashenko, S.G.Mardanly 80

Instructions for Authors 85

Значение исследований по распространению факторов патогенности возбудителей болезней человека

Риски в области обеспечения биологической безопасности в наибольшей степени связаны с возможностью появления новых патогенов в результате изменения климата, которое приводит к проявлению «законсервированных» на многие тысячи лет, например, в вечной мерзлоте, бактерий и вирусов, проникновением человека в ранее малодоступные среды – глубины океанов, горные массивы, места обитания неизвестных видов эукариот, имеющих собственные патогены. К этому можно отнести и малоизученный мир микробов в глубинных слоях земли, где они встречаются до глубины 5 км. Биомасса бактерий, которые никогда не поднимались на поверхность земли, составляет до 20 млрд т, они имеют собственный метаболизм и стратегию выживания – свои ферменты и токсины, как, например, сапрофитный организм, вырабатывающий смертельный для человека ботулотоксин.



В стратегии поиска новых патогенов следует выделить несколько значимых этапов: зарегистрированный клинический синдром, выделение чистой культуры или биологической структуры (посев на среды, культуры клеток, куриные эмбрионы), заражение лабораторных животных (трансгенных, нокаутных), метагеномный анализ (метагеномное или таргетное секвенирование), масс-спектрометрию, клеточный сортинг с моноклональными антителами и некоторые другие, вспомогательные.

Наиболее сложной разрабатываемой в настоящее время проблемой является поиск принципиально нового патогена, не имеющего аналогов. Для этих целей создаются и развиваются программы, предсказывающие наличие неизвестного патогена в материале по содержанию факторов вирулентности или близких к ним аналогов на основе данных прежде всего метагеномного анализа. Выявление, каталогизация и создание баз данных по таким факторам (генам и островам патогенности), которые в зарубежных научных публикациях в области биобезопасности именуют «последовательностями, вызывающими озбоченность», является приоритетной задачей многих групп исследователей.

Основные факторы вирулентности микроорганизмов вызывают различные типы повреждений органов и тканей организма человека, к которым следует отнести: цитотоксичность, или разрушение клеточной мембраны, деградацию тканей, инвалидизацию органов и воспаление. Наибольшее значение имеет влияние на иммунную систему организма человека, от которой во многом зависит возможность его выживания. К типам нарушения иммунной системы при действии факторов патогенности следует отнести: подавление иммунной сигнализации хозяина, сопротивление фагоцитозу, нейтрализацию комплемента хозяина, противодействие антимикробному пептиду, сопротивление окислительному уничтожению и нейтрализацию иммуноглобулина хозяина, повреждение цитокинов хозяина, ингибирование презентации антигена (Godbold GD, Hewitt FC, Kappell AD et al. (2023). *Front Bioeng Biotechnol.* 11:1124100. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1124100).

Например, если рассмотреть факторы вирулентности сибиреязвенного микроба, то их окажется достаточно много и с разными функциями. Аденозинсинтаза А ингибирует врожденный иммунитет, подавляет высвобождение воспалительных цитокинов. Антролизин О разрушает ткани, обеспечивает связывание с клеточной поверхностью, образует поры, способствует преодолению клеточных барьеров. Белки поверхности спор (BclA) обеспечивают сопротивление комплементу хозяина. Белки (BslA) S-слоя обеспечивают адгезию и связывание с ламинином, способствуют преодолению барьера при контакте с клеточной поверхностью. Протеаза ClpX способствует разрушению тканей, нарушает связывание антимикробного пептида. Иммунный ингибитор А металлопептидаза опосредует преодоление барьера, обеспечивая распространение патогена в организме хозяина. Фосфолипаза PI-PI.C нарушает сигнализацию толл-подобных рецепторов, подавляет активацию дендритных клеток, расщепляет мембранные фосфолипиды.

Супероксиддисмутазы, которых у сибиреязвенного микроба четыре, способствуют детоксикации свободных радикалов и обеспечивают сопротивление окислительному киллингу. Протективный антиген обеспечивает связывание с гликопротеином клеточной поверхности, вторжение в клетку макромолекулы и участвует в образовании пор. Отечный фактор модулирует синтез цАМФ и транскрипцию в клетке хозяина, подавляет высвобождение воспалительных цитокинов, вызывает активацию дендритных клеток, что в конечном итоге приводит к подавлению иммунной сигнализации хозяина и выведению из строя органа. Летальный фактор опосредует связывание с поверхностью клетки, преодоление барьера, подавляет высвобождение воспалительных цитокинов, сигнализацию MAPK, активацию дендритных клеток, усиливает активацию инфламмосомы, нарушает эпителиальный слой. Такие или подобные им факторы патогенности присутствуют и у других вирулентных бактерий, обеспечивая универсальные механизмы инвазии, распространения в организме и повреждения его органов и систем.

Если обобщить основные свойства факторов патогенности, то можно выделить несколько основных их типов. Повреждающий фактор усиливает патогенные свойства агента, может индуцировать у непатогена свойства как у условного патогена. Подрывающий иммунитет фактор усиливает патогенные свойства агента, нарушает иммунитет или эффективность вакцинации, может способствовать преодолению межвидового барьера, повышает восприимчивость хозяина к агенту, индуцирует у непатогена свойства как у условного патогена, может позволить непатогену заражать новых хозяев. Может повысить восприимчивость популяции хозяев к агенту. Фактор адгезии расширяет ареал хозяина или тропизм возбудителя, повышает восприимчивость популяции хозяина к возбудителю. Фактор инвазивности изменяет ареал обитания или тропизм патогена, повышает восприимчивость популяции хозяев к агенту. Диссеминирующий фактор (распространение) усиливает вредные последствия действия патогена, повышает трансмиссивность, способность к распространению, восприимчивость хозяев к патогену.

В настоящее время существуют базы данных факторов патогенности, в которых представлены основные гены вирулентности множества бактерий. Например, VFDB, virulence factors of pathogenic bacteria (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) – база, позволяющая определять, как формировались современные патогенные бактерии в результате горизонтального переноса генов вирулентности путем обмена генетическим материалом и закрепления факторов, способствующих их паразитизму на конкретном хозяине, изучать наличие факторов вирулентности в геномных островах горизонтального происхождения и вне геномных островов. Однако такие базы далеко не полны и даже фрагментарны, что накладывает ограничения на их использование для прогнозирования наличия новых патогенов в исследуемом материале. В этой связи задачей для нас является создание отечественной полноценной базы факторов вирулентности патогенов.

Одним из важных направлений исследований патогенов является изучение возможности переноса генов вирулентности к сапрофитам. Недавно отечественными учеными показано, что при формировании поликультуральных биопленок происходит горизонтальный перенос генов, кодирующих факторы патогенности от *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes* к морским сапротрофным бактериям. Установлена способность морских бактерий *Bacillus* sp. и *Pseudomonas japonica* к образованию биопленок с патогенами. Впервые у морского сапротрофного штамма *Bacillus* sp. выявлены проявления гиалуронидазной, протеолитической и гемолитической активности после культивирования в поликультуральной биопленке с листериями. Сделан вывод о том, что сапротрофные морские бактерии, получившие от патогенных энтеробактерий факторы вирулентности, включая гены устойчивости к антибиотикам, могут играть роль в изменении биологических свойств других членов морского микробного сообщества (Eskova AI, Andryukov BG, Yakovlev AA. BioTech. 2022;11:17. DOI: 10.3390/biotech11020017).

Эта работа показывает, какой резервуар факторов патогенности может создаваться на базе сапрофитов, например в курортных зонах, куда съезжаются миллионы людей, и какой высокий риск появления новых или усиления известных патогенов это может создавать. А между тем у сапрофитов никто не выявляет такие факторы – санэпидслужба выделяет только известные патогены, а специалисты общей микробиологии исследуют биологию и биохимию сапрофитных популяций.

К необходимым мерам по развитию детекции факторов патогенности и их идентификации следует отнести создание «Национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов», который позволит выявлять весь спектр факторов патогенности у коллекционных штаммов, так как каталог содержит полный геном и соответствующую поисковую систему. При этом необходимо будет применять методы системной биологии учитывая большой массив данных.

Главный редактор журнала «Бактериология»,
директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
академик РАН И.А.Дятлов

Динамика и клиническая значимость резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибактериальным препаратам

О.Ю.Филимонова¹, Т.Б.Сафонова¹, Л.В.Золотарева¹, Л.А.Любасовская¹, Т.А.Савинова², В.Ю.Ананьева³

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Российская Федерация;

²ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

³Медицинские центры «Андреевские больницы – НЕБОЛИТ», Москва, Российская Федерация

Растущая устойчивость пневмококков к антибиотикам приводит к значительным сложностям в подборе эффективного лечения. Анализ данных о распространении в Российской Федерации резистентности *Streptococcus pneumoniae* к значимым антибактериальным препаратам и сравнение профиля чувствительности данного патогена в динамике показали снижение чувствительности *S. pneumoniae* к «классическим» β-лактамам и макролидам. Высокой активностью в отношении *S. pneumoniae* характеризуются цефтаролин и респираторные фторхинолоны. Однако появление единичных резистентных штаммов свидетельствует о необходимости дальнейшего мониторинга чувствительности *S. pneumoniae* к данным препаратам. Самую высокую активность в отношении *S. pneumoniae* продемонстрировали ванкомицин и линезолид. Все исследованные штаммы, резистентные к β-лактамам, макролидам, линкозамидам и респираторным фторхинолонам, были чувствительны к данным препаратам.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмококки, определение чувствительности к противомикробным препаратам, резистентность к антибиотикам, минимальная подавляющая концентрация

Для цитирования: Филимонова О.Ю., Сафонова Т.Б., Золотарева Л.В., Любасовская Л.А., Савинова Т.А., Ананьева В.Ю. Динамика и клиническая значимость резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибактериальным препаратам. Бактериология. 2023; 8(4): 7–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-7-13

Dynamics and clinical significance of resistance *Streptococcus pneumoniae* to antibacterial drugs

O.Y.Filimonova¹, L.A.Lyubasovskaya¹, T.B.Safonova¹, L.V.Zolotareva¹, T.A.Savinova², V.Yu.Ananyeva³

¹Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

³Medical centers «Andreevsky Hospitals – NEBOLIT», Moscow, Russian Federation

Growing resistance of pneumococci to antibiotics leads to significant difficulties in selection of effective treatment. Analysis of data about distribution of *Streptococcus pneumoniae* resistance to significant antibacterial preparations in the Russian Federation and comparison of sensitivity profile of microorganism in dynamics showed decrease of *S. pneumoniae* sensitivity to «classical» beta-lactams, macrolides. High activity against *S. pneumoniae* is characterized by ceftarolin and respiratory fluoroquinolones. However, the appearance of single resistant strains indicates the necessity of further monitoring of *S. pneumoniae* resistance to these drugs. Vancomycin and linezolid demonstrated the highest activity against *S. pneumoniae*. All investigated strains resistant to beta-lactams, macrolides, lincosamides and respiratory fluoroquinolones were sensitive to these drugs.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococci, antimicrobial susceptibility testing, antibiotic resistance, minimal inhibitory concentration

For citation: Filimonova O.Y., Lyubasovskaya L.A., Safonova T.B., Zolotareva L.V., Savinova T.A., Ananyeva V.Yu. Dynamics and clinical significance of resistance *Streptococcus pneumoniae* to antibacterial drugs. Bacteriology. 2023; 8(4): 7–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-7-13

Для корреспонденции:

Филимонова Ольга Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»

Адрес: 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Телефон: (926) 220-4044

E-mail: omega8@bk.ru

Статья поступила 12.05.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Olga Yu. Filimonova, PhD, MD, Senior Lecturer of the Z.V.Ermolyeva Department of Microbiology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education

Address: 2/1, building 1 Barrikadnaya str., Moscow, 125993, Russian Federation

Phone: (926) 220-4044

E-mail: omega8@bk.ru

The article was received 12.05.2023, accepted for publication 25.12.2023

Пневмококковая инфекция признается одной из опасных из всех предупреждаемых вакцинопрофилактикой болезней. По данным Всемирной организации здравоохранения, до внедрения универсальной вакцинации эта инфекция ежегодно приводила к смерти 1,6 млн человек, из которых от 0,7 до 1 млн – дети. Около 40% смертности детей приходится на первые 5 лет жизни [1].

Несмотря на название, *Streptococcus pneumoniae* вызывает многие виды пневмококковых инфекций (ПИ), отличных от пневмонии. Этот возбудитель становится причиной таких болезней, как пневмококковая пневмония (до 70%), воспаление среднего уха (~25%), гнойный пневмококковый менингит (5–15% всех бактериальных менингитов), воспаление внутренней оболочки сердца (~3%), пазух носа, суставов, заражение крови и других клинических форм, вызывающих тяжелые последствия для человека [1].

Распространенность инвазивных ПИ составляет от 10 до 100 случаев на 100 тыс. населения. Вариабельность показателя находится в зависимости от возраста пациентов, их социально-экономических и генетических особенностей, а также различий статистического учета в разных странах [1].

Лечение внегоспитальных ПИ верхних и нижних дыхательных путей легкой и среднетяжелой степени тяжести при отсутствии осложнений проводят амбулаторно. Антибиотиками выбора являются пероральные формы амоксициллина, в т.ч. в комбинации с ингибиторами β-лактамаз при подозрении на смешанную этиологию пневмонии и поражений ЛОР-органов, а также цефалоспорины 2-го и 3-го поколений: цефуроксим, цефотаксим и цефтриаксон. Макролиды в комбинации с β-лактамами также рекомендуются для эмпирического лечения внегоспитальной пневмонии [2].

Растущая устойчивость пневмококков к антибиотикам приводит к значительным сложностям в подборе эффективного лечения.

Целью данной работы является анализ данных о распространении в Российской Федерации резистентности *S. pneumoniae* к значимым антибактериальным препаратам, сравнение профилей чувствительности этого патогена в 2004–2005 и 2014–2017 гг., интерпретация результатов с точки зрения их значимости для обоснования эффективной эмпирической терапии ПИ.

Материалы и методы

В работу включены результаты трех исследований, выполненных в 2004–2005 и 2014–2017 гг.

В период 2004–2005 гг. исследованы клинически значимые штаммы, выделенные в лабораториях лечебных учреждений Москвы, Санкт-Петербурга, Ярославля, Томска, Иркутска ($n = 582$ в 2004 г. и $n = 594$ в 2005 г.) [3,4].

В 2014–2017 гг. исследованы клинически значимые штаммы ($n = 519$), выделенные в лабораториях лечебных учреждений 18 городов (ПеГАС) [5].

Оценка динамики антибиотикорезистентности учитывала, что до 2014 г. при определении чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) использовались стандарты Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [6].

С 2014 г. в России применяются национальные клинические рекомендации по определению чувствительности ми-

кроорганизмов к АМП, которые базируются на стандартах Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) [7].

Переход на новые стандарты определения чувствительности привел к некоторым изменениям методологии определения чувствительности *S. pneumoniae*, а также изменению пороговых значений для оценки клинической категории чувствительности для ряда антибиотиков. В данном исследовании для более объективной оценки роста антибиотикорезистентности оценивали динамику распределения чувствительных, умеренно чувствительных и устойчивых штаммов *S. pneumoniae* по минимальной подавляющей концентрации (МПК) для каждого АМП.

Полученные данные сравнивали с «эпидемиологической точкой отсечения» – постоянным видовым признаком бактерий, не зависящим от изменяющихся обстоятельств и показывающим наибольшее значение МПК микроорганизма, не имеющего фенотипически выявляемых приобретенных механизмов резистентности к препарату. На основании эпидемиологической точки отсечения выявляется принадлежность микроорганизма к «дикому» (не имеющему мутационных или других приобретенных механизмов устойчивости к конкретному антибиотику) или «недикому» типу (обладающему мутационными или другими приобретенными механизмами устойчивости к конкретному антибиотику) [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Динамика чувствительности к пенициллину

Распределение МПК пенициллина к *S. pneumoniae* (%) представлено на рис. 1. «Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК $\leq 0,06$ мг/л.

На основании визуальной оценки можно заключить, что характер распределения МПК в отношении «дикой» популяции изученных штаммов принципиально сходен.

Из представленных данных видно, что доля штаммов, чувствительных при увеличенной экспозиции, в 2014–2017 гг. значительно увеличилась. Если в 2004 и 2005 гг. доля чувствительных к пенициллину штаммов составляла 92,6 и 90,2% соответственно, то в 2014–2017 гг. снизилась до 65,1%. МПК₅₀ выросла на 1 разведение, но находится в чувствительном диапазоне, а МПК₉₀ – в 5 раз, с 0,06 до 2 мг/л, что не может не вызывать тревоги. Значение МПК₉₀, расположенное на границе диапазонов чувствительности при увеличенной экспозиции и резистентности, свидетельствуют о снижении чувствительности пневмококков к данному препарату.

Динамика чувствительности к ампициллину

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК $\leq 0,06$ мг/л. Похожая ситуация складывается и с МПК ампициллина, однако значение МПК₉₀ находится в диапазоне резистентности (рис. 2).

Если в 2004–2005 гг. доля чувствительных к ампициллину штаммов составляла 97 и 95% соответственно, то в 2014–2017 гг. снизилась до 75%.

Динамика чувствительности к цефтриаксону

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК $\leq 0,06$ мг/л. Ситуация с чувствительностью к цефалоспорином также из-

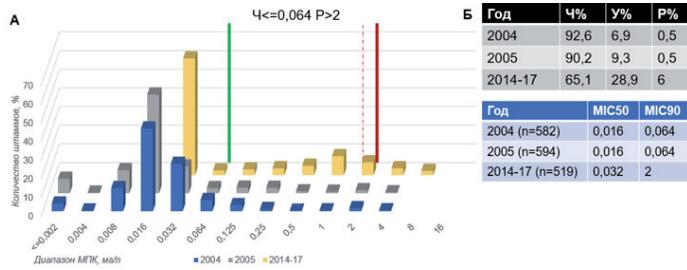


Рис. 1. Распределение МПК пенициллина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 1. Distribution of penicillin MPC for *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

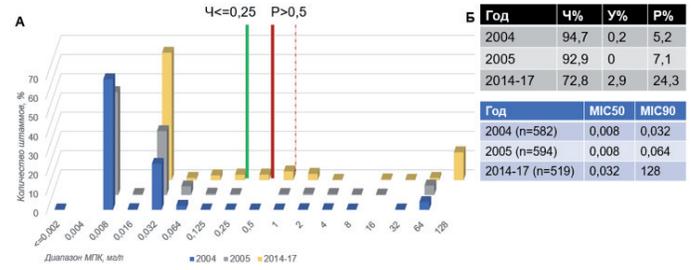


Рис. 5. Распределение МПК эритромицина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 5. Distribution of erythromycin MIC to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

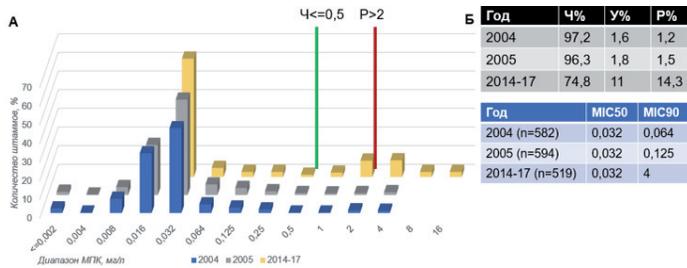


Рис. 2. Распределение МПК ампициллина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 2. Distribution of ampicillin MIC to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

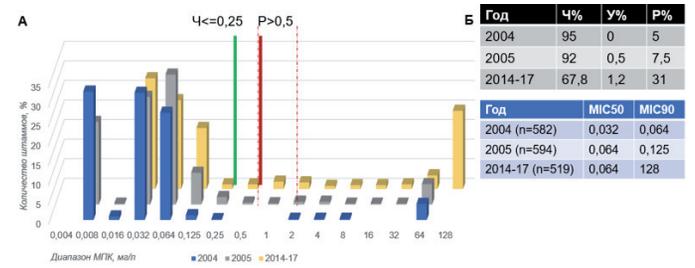


Рис. 6. Распределение МПК азитромицина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 6. Distribution of azithromycin MIC to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

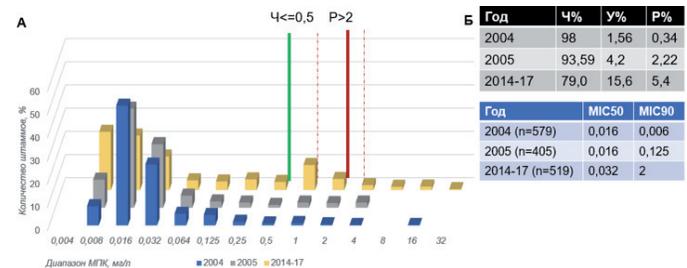


Рис. 3. Распределение МПК цефтриаксона для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 3. Distribution of ceftriaxone MIC to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

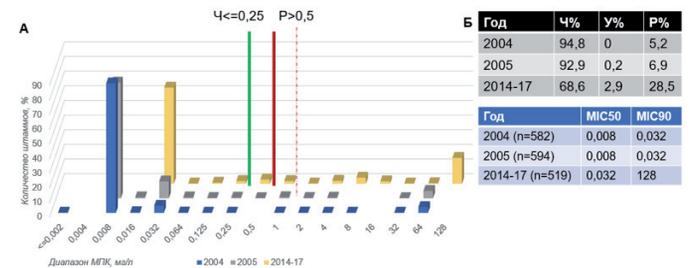


Рис. 7. Распределение МПК кларитромицина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 7. Distribution of clarithromycin MIC to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

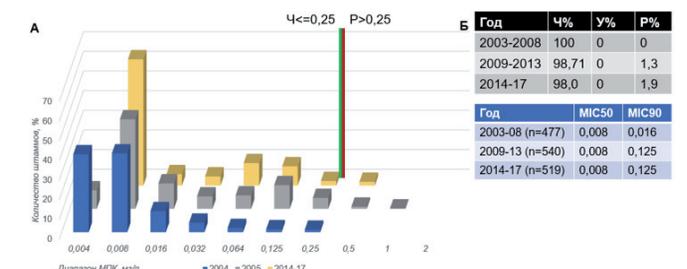


Рис. 4. Распределение МПК цефтаролина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 4. Distribution of ceftaroline MIC to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

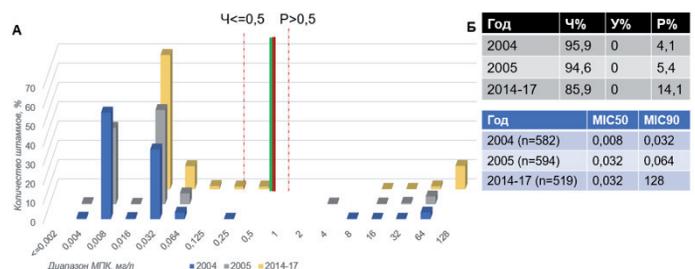


Рис. 8. Распределение МПК клиндамицина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 8. Distribution of MIC of clindamycin to *S. pneumoniae* strains, %.
A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

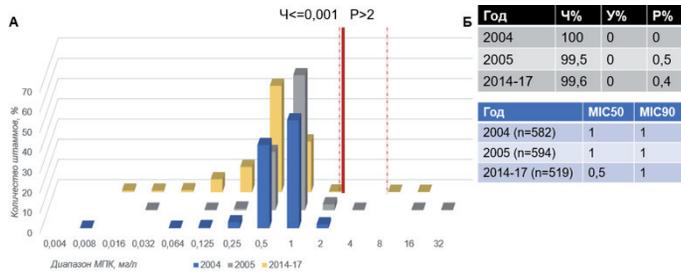


Рис. 9. Распределение МПК левофлоксацина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 9. Distribution of levofloxacin MIC to *S. pneumoniae* strains, %. A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

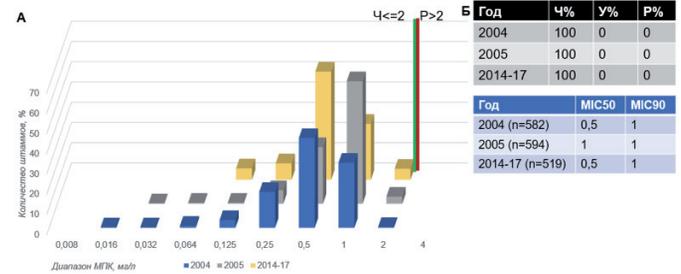


Рис. 12. Распределение МПК линезолида для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 12. Distribution of linezolid MIC to *S. pneumoniae* strains, %. A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

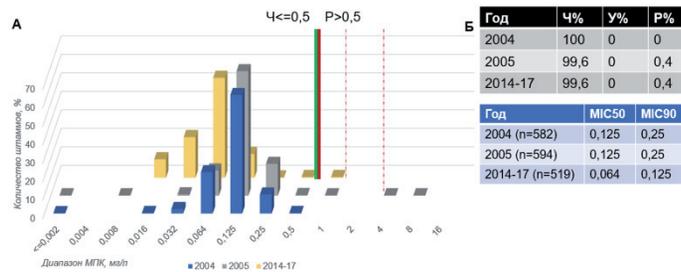


Рис. 10. Распределение МПК моксифлоксацина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 10. Distribution of moxifloxacin MIC to *S. pneumoniae* strains, %. A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

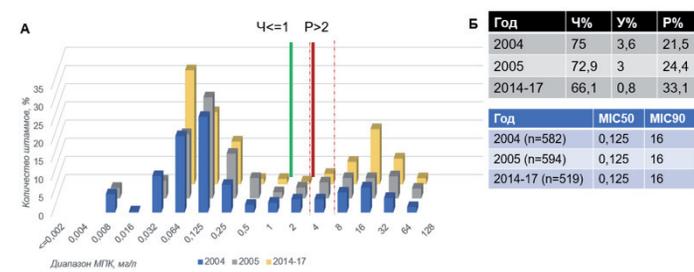


Рис. 13. Распределение МПК тетрациклина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 13. Distribution of tetracycline MIC to *S. pneumoniae* strains, %. A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

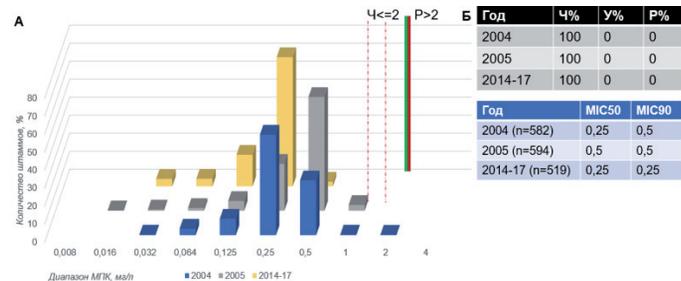


Рис. 11. Распределение МПК ванкомицина для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 11. Distribution of vancomycin MIC to *S. pneumoniae* strains, %. A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

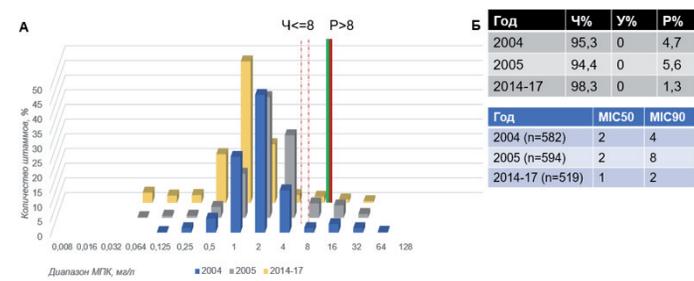


Рис. 14. Распределение МПК хлорамфеникола для штаммов *S. pneumoniae*, %.

А – гистограмма, Б – таблица со значениями по категориям чувствительности.

Fig. 14. Distribution of chloramphenicol MIC to *S. pneumoniae* strains, %. A – histogram, B – table with values by sensitivity categories.

менилась (рис. 3). Видно, что доля штаммов, чувствительных к цефтриаксону при увеличенной экспозиции, в 2014–2017 гг. значительно увеличилась (с 1,56% в 2004 г. до 15,6% в 2014–2017 гг.). Если доля чувствительных к цефтриаксону штаммов в 2004 г. составляла 98%, то в 2005 г. она снизилась до 93,59%, а в 2014–2017 гг. – до 79%. Наблюдается аналогичная с пенициллином картина по изменению МПК₅₀ и МПК₉₀: МПК₅₀ выросла на 1 разведение, но находится в чувствительном диапазоне, а МПК₉₀ – в 5 раз, с 0,06 до 2 мг/л, что не может не вызывать тревоги.

Эти данные свидетельствуют о снижении чувствительности пневмококков к данному препарату.

Динамика чувствительности к цефтаролину

Одним из цефалоспоринов, который показал хорошую активность в отношении пневмококков в исследовании ПеГАС 2014–2017 гг., был цефтаролин. Однако, если проследить динамику распространения резистентности к данному препарату, то увидим, что когда цефтаролин стал применяться в 2003–2004 гг., все штаммы были чувствительны. Но уже через 5 лет появились сведения о резистентных штаммах, доля которых составила 1,3% и к 2014–2017 гг. увеличилась до 1,9% (рис. 4). Сведения об «эпидемиологической точке отсечения» цефтаролина в базе EUCAST отсутствуют. МПК₅₀ за время использования препарата пока остается на одном уровне и составляет 0,008 мг/л. МПК₉₀

выросла на 1 разведение, но находится в чувствительном диапазоне (0,125 мг/л). Появление резистентных штаммов указывает на необходимость дальнейшего мониторинга резистентности *S. pneumoniae*.

Динамика чувствительности к эритромицину

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК $\leq 0,125$ мг/л. Если в 2004–2005 гг. доля чувствительных к эритромицину штаммов составляла 95 и 93% соответственно, то в 2014–2017 гг. снизилась до 73% (рис. 5).

Отмечается рост количества штаммов с высокой резистентностью (128 МПК). Хотя МПК₅₀ (0,03) находится в чувствительном диапазоне, по сравнению с 2004–2005 гг. она увеличилась на 2 разведения. Значение МПК₉₀, расположенное в зоне высокой резистентности, свидетельствует о неуклонном снижении чувствительности пневмококков к данному препарату. Отмечается снижение чувствительности пневмококков и к другим представителям 14- и 15-членных макролидов (рис. 6, 7).

Динамика чувствительности к клиндамицину

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК $\leq 0,25$ мг/л. Представитель линкозамидов клиндамицин характеризовался более высокой активностью по сравнению с макролидами. Доля чувствительных изолятов составила 85,9% в 2014–2017 гг., что на 10% ниже, чем в 2004–2005 гг. Однако значение МПК₉₀ было равно 128 мг/л и соответствовало диапазону устойчивости (рис. 8).

Динамика чувствительности к левофлоксацину, моксифлоксацину

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК ≤ 2 мг/л и МПК $\leq 0,5$ мг/л соответственно. На основании визуальной оценки можно заключить, что характер распределения МПК в отношении «дикой» популяции изученных штаммов принципиально сходен. Динамика распределения МПК за периоды наблюдения, значения МПК₅₀ и МПК₉₀ не изменились и располагаются в чувствительном диапазоне, что свидетельствует о сохранении высокой активности данных препаратов в отношении *S. pneumoniae*. Появление единичных резистентных штаммов свидетельствует о необходимости мониторинга резистентности *S. pneumoniae* к данному классу АМП (рис. 9, 10).

Динамика чувствительности к ванкомицину, линезолиду

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК ≤ 1 мг/л и МПК ≤ 4 мг/л соответственно. На основании визуальной оценки можно заключить, что характер распределения МПК в отношении «дикой» популяции изученных штаммов принципиально сходен. Динамика распределения МПК за периоды наблюдения, значения МПК₅₀ и МПК₉₀ не изменились и располагаются в чувствительном диапазоне, что свидетельствует о сохранении высокой активности данных препаратов в отношении *S. pneumoniae*. Все исследованные штаммы, резистентные к β -лактамам, макролидам, линкозамидам и респираторным фторхинолонам, были чувствительны к данным препаратам (рис. 11, 12).

Динамика чувствительности к тетрациклину

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК ≤ 1 мг/л. На основании визуальной оценки можно заключить, что характер распределения МПК в отношении «дикой» популяции изученных штаммов принципиально сходен. На протяжении всех лет в России сохраняется высокий уровень резистентности пневмококков к тетрациклину (рис. 13).

Динамика чувствительности к хлорамфениколу

«Эпидемиологическая точка отсечения» – МПК ≤ 8 мг/л. К хлорамфениколу были чувствительны 98,2% штаммов в 2014–2017 гг., что выше по сравнению с периодом 2004–2005 гг. Значения МПК₅₀ и МПК₉₀ снизились на 1–2 разведения и соответствуют диапазону чувствительности, в отличие от 2004–2005 гг. Скорее всего, это связано с тем, что неблагоприятный профиль безопасности ограничивает применение данного препарата для терапии пневмококковых менингитов, за исключением случаев, когда нет альтернативы (рис. 14).

Полученные данные согласуются с результатами исследований ПеГАС (2004–2005 гг.), SOAR (2014–2016 гг.) [8, 9]. При анализе информации «Карты антибиотикорезистентности России» за 2014–2017 гг. также отмечены существенные изменения в чувствительности пневмококков по сравнению с более ранними периодами времени 2004–2005 гг. [10]. В 2004–2005 гг. наиболее активными препаратами в отношении *S. pneumoniae* были β -лактамы, макролиды, линкозамиды, левофлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфеникол и ванкомицин. Высокая резистентность наблюдалась к тетрациклину, котримоксазолу.

В 2004–2005 гг. проблема пенициллин-резистентных пневмококков была не так актуальна для России, процент устойчивых штаммов достигал 7–9%. В этот же период времени отмечен рост резистентности *S. pneumoniae* к пенициллину: в США – 21,2% [11], в Испании – 22,9% [12], в Японии – 44,5% [13].

В 2004–2005 гг. в РФ наблюдалась относительно низкая частота резистентности *S. pneumoniae* к макролидам – 2–7%. А в то же время уровень устойчивых штаммов к этой группе антибактериальных препаратов достигал в США 29,3%, в Испании – 81,3%, в Японии – 81,9% [11–13].

В 2014–2016 гг. ситуация в РФ изменилась в худшую сторону: чувствительными к пенициллину по критериям EUCAST были только 65% штаммов *S. pneumoniae*. По данным международного исследования TEST (2015–2017 гг.), уровень чувствительности к пенициллину в мире варьировал от 29,9% в Азии до 67,6% в Европе и в среднем составил 61,7% [14]. Для сравнения, результаты международного исследования SOAR (2014–2016 гг.) показали уровень чувствительности к пенициллину в Чехии – 99,5% [15], в Греции – 88,9% [16], в Болгарии – 86,6% [17], в Румынии – 22,2% [17], доля чувствительных к пенициллину штаммов в России составила 67% [9].

Уровень нечувствительных пневмококков к макролидам в РФ в период 2014–2015 гг. составил 28–31%. По данным исследования SOAR (2014–2016 гг.), резистентность *S. pneumoniae* к эритромицину в Чехии составила 10% [15], в Болгарии – 24,4% [17], в Греции – 50,5% [16], в Румынии – 72,1% [17].

Заключение

Таким образом, анализ данных о распространении в Российской Федерации резистентности *S. pneumoniae* к значимым антибактериальным препаратам и сравнение профиля чувствительности микроорганизма в 2004–2005 гг. и 2014–2017 гг. показали:

β-лактамы АМП. Доля чувствительных штаммов снизилась (пенициллин – с 90 до 65%, ампициллин – с 97 до 75%, цефтриаксон – с 96 до 79%). Возросла доля пневмококковых штаммов, чувствительных при увеличенной экспозиции к β-лактамам АМП (пенициллин – с 8 до 29%; ампициллин – с 1,7 до 11%, цефтриаксон – с 4 до 15%).

МПК₉₀ у пенициллина и цефтриаксона значительно выросла – в 5 раз, с 0,06 до 2 мг/л, и находится на границе диапазонов чувствительности при увеличенной экспозиции и резистентности, что не может не вызывать тревоги.

Значение МПК₉₀ ампициллина находится в диапазоне резистентности.

Цефтаролин показал хорошую активность к пневмококкам. Однако появление резистентных штаммов указывает на необходимость дальнейшего мониторинга резистентности *S. pneumoniae*.

Макролиды. Прослеживается неуклонное снижение чувствительности пневмококков к макролидам. Отмечается рост количества штаммов с высокой резистентностью (128 МПК). Значение МПК₉₀, расположенное в зоне высокой резистентности, свидетельствует о неуклонном снижении чувствительности пневмококков к данной группе препаратов.

Монотерапия макролидами будет недостаточно эффективна при лечении инфекций, вызванных резистентными к пенициллину пневмококками.

Респираторные фторхинолоны (левофлоксацин, моксифлоксацин) характеризуются высокой активностью в отношении *S. pneumoniae*. Динамика распределения МПК за периоды наблюдения, значения МПК₅₀ и МПК₉₀ не изменились и располагаются в чувствительном диапазоне, что свидетельствует о сохранении высокой активности данных препаратов в отношении *S. pneumoniae*. Появление единичных резистентных штаммов свидетельствует о необходимости мониторинга резистентности *S. pneumoniae* к данному классу АМП.

Ванкомицин и линезолид продемонстрировали самую высокую активность в отношении всех исследованных штаммов. Динамика распределения МПК за периоды наблюдения, значения МПК₅₀ и МПК₉₀ не изменились и располагаются в чувствительном диапазоне, что свидетельствует о сохранении высокой активности данных препаратов в отношении *S. pneumoniae*. Все исследованные штаммы, резистентные к β-лактамам, макролидам, линкозамидам и респираторным фторхинолонам, были чувствительны к данным препаратам.

Следует отметить, что определение чувствительности *S. pneumoniae* к антибиотикам имеет определенные методологические особенности и не всегда выполнимо в практических микробиологических лабораториях. Получение достоверных данных по антибиотикорезистентности этих микроорганизмов возможно в рамках многоцентровых исследований с централизованным определением чувствительности выделенных возбудителей референтным методом (методом микроразведений). Кроме того, антибиотикорезистентность

существенно различается в разных странах и географических регионах, что во многом зависит от практики применения антибиотиков, вакцинации, климатических и миграционных факторов.

Поэтому мониторинг устойчивости клинических штаммов *S. pneumoniae* к противомикробным препаратам является основой для создания и оптимизации рекомендаций по эмпирической терапии. Анализ динамики распространения резистентных изолятов *S. pneumoniae* позволяет выбрать оптимальное лечение и улучшение исходов ведения больных с пневмококковой инфекцией.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Чучалин АГ, Брико НИ, Авдеев СН, Белевский АС, Биличенко ТН, Демко ИВ, и др. Федеральные клинические рекомендации по вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции у взрослых. Пульмонология. 2019;29(1):19-34.
2. Клинические рекомендации. Внебольничная пневмония у взрослых – 2021-2022-2023 (25.08.2021). Утверждены Минздравом РФ. ID: 654. Дата размещения 25.08.2021 на сайте МЗ. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/654_1?ysclid=lovvdkaхо75775612
3. Савинова ТА, Сидоренко СВ, Буданов СВ, Грудинина СА. Динамика распространения резистентности к бета-лактамам антибиотикам среди *Streptococcus pneumoniae* и ее клиническая значимость. Антибиотики и химиотерапия. 2010;55(1-2):12-20.
4. Филимонова ОЮ. Распространение и молекулярные механизмы резистентности к макролидным антибактериальным препаратам микроорганизмов рода *Streptococcus* в Российской Федерации. Тема диссертации и автореферата по ВАК РФ 03.02.03, 2010. Режим доступа: <https://www.dissercat.com/content/rasprostraneniye-i-molekulyarnye-mekhanizmy-rezistentnosti-k-makrolidnym-antibakterialnym-p?ysclid=lovvtayioz942106595>
5. Иванчик НВ, Чагарян АН, Сухорукова МВ, Козлов РС, Дехнич АВ, Кречикова ОИ, и др. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования ПеГАС 2014–2017. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019;21(3):230-237. DOI: 10.36488/cmasc.2019.3.230-237
6. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009;72-75.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver.9.0, 2019. Available at: www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v9.0
8. Козлов РС, Сивая ОВ, Кречикова ОИ, Иванчик НВ. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009 гг. Результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010;12(4):329-241.
9. Torumkuney D, Mayanskiy N, Edelstein M, Sidorenko S, Kozhevnikov R, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014–16 in Russia. J Antimicrob Chemother 2018;73(Suppl 5):v14-v21. DOI:10.1093/jac/dky065

- Карта антибиотикорезистентности России, сайт. Обновляется ежегодно. Режим доступа: <https://amrmap.ru/> (дата обращения: 13.01.2023). Текст: электронный.
- Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2008;11:7-11. DOI: 10.1186/1476-0711-7-1
- Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, et al.; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jul;54(7):2953-9. DOI: 10.1128/AAC.01548-09
- Inoue M, Farrell DJ, Kaneko K, Akizawa K, Fujita S, Kaku M, et al. Antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan during PROTEKT years 1-5 (1999-2004). *Microb Drug Resist*. 2008 Jun;14(2):109-17. DOI: 10.1089/mdr.2008.0806
- Zhang Z, Chen M, Yu Y, Pan S, Liu Y. Antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected globally between 2015 and 2017 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). *Infect Drug Resist*. 2019;12:1209-1220. DOI: 10.2147/IDR.S203121
- Torunkuney D, Zemlickova H, Maruscak M, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in the Czech Republic. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(suppl_5):v22-v27. DOI: 10.1093/jac/dky067
- Torunkuney D, Paparaskevas J, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(suppl_5):v36-v42. DOI: 10.1093/jac/dky068
- Torunkuney D, Nica M, Nistor I, Vatcheva-Dobrevska R, Petrovic V, Stoica A, et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Bulgaria, Romania, Serbia and Croatia. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(suppl_5):v2-v13. DOI: 10.1093/jac/dky066
- Kozlov RS, Sivaya OV, Krechikova OI, Ivanchik NV. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* resistance to antibiotics in Russia for the period 1999-2009. Results of a multicenter prospective study of PeGAS. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. 2010;12(4):329-241. (In Russian).
- Torunkuney D, Mayanskiy N, Edelstein M, Sidorenko S, Kozhevnikov R, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Russia. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(Suppl 5):v14-v21. DOI:10.1093/jac/dky065
- Карта антибиотикорезистентности России, сайт. Обновляется ежегодно. Available at: <https://amrmap.ru/> (date of application: 13.01.2023). Текст: электронный. (In Russian).
- Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2008;11:7-11. DOI: 10.1186/1476-0711-7-1
- Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, et al.; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jul;54(7):2953-9. DOI: 10.1128/AAC.01548-09
- Inoue M, Farrell DJ, Kaneko K, Akizawa K, Fujita S, Kaku M, et al. Antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan during PROTEKT years 1-5 (1999-2004). *Microb Drug Resist*. 2008 Jun;14(2):109-17. DOI: 10.1089/mdr.2008.0806
- Zhang Z, Chen M, Yu Y, Pan S, Liu Y. Antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected globally between 2015 and 2017 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). *Infect Drug Resist*. 2019;12:1209-1220. DOI: 10.2147/IDR.S203121
- Torunkuney D, Zemlickova H, Maruscak M, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in the Czech Republic. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(suppl_5):v22-v27. DOI: 10.1093/jac/dky067
- Torunkuney D, Paparaskevas J, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(suppl_5):v36-v42. DOI: 10.1093/jac/dky068
- Torunkuney D, Nica M, Nistor I, Vatcheva-Dobrevska R, Petrovic V, Stoica A, et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Bulgaria, Romania, Serbia and Croatia. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(suppl_5):v2-v13. DOI: 10.1093/jac/dky066

References

- Chuchalin AG, Briko NI, Avdeev SN, Belevsky AS, Bilichenko TN, Demko IV, et al. Federal clinical recommendations for vaccine prevention of pneumococcal infection in adults. *Pulmonology*. 2019;29(1):19-34. DOI: 10.18093/0869-0189-2019-29-1-19-34 (In Russian).
- Clinical recommendations. Community-acquired pneumonia in adults – 2021-2022-2023 (08/25/2021). Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation. ID: 654. Posted on August 25, 2021 on the website of the Ministry of Health of the Russian Federation. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/654_1?ysclid=lovvdkaхо75775612 (In Russian).
- Savinova TA, Sidorenko SV, Budanov SV, Grudinina SA. Dynamics of the spread of resistance to betalactam antibiotics among *Streptococcus pneumoniae* and its clinical significance. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2010;55(1-2):12-20. (In Russian).
- Filimonova OYu. Distribution and molecular mechanisms of resistance to macrolide antibacterial drugs in microorganisms of the genus *Streptococcus* in the Russian Federation. The topic of the dissertation and abstract on the Higher Attestation Commission of the Russian Federation 02/03/03, 2010. Available at: <https://www.disserscat.com/content/rasprostranenie-i-molekulyarnye-mekhanizmy-rezistentnosti-k-makrolipidnym-antibakterialnym-p?ysclid=lovvtayioz942106595> (In Russian).
- Ivanchik NV, Chagaryan AN, Sukhorukova MV, Kozlov RS, Dekhnich AV, Krechikova OI, et al. Antibiotic resistance of clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* in Russia: results of the multicenter epidemiological study PeGAS 2014-2017. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. 2019;21(3):230-237. DOI: 10.36488/cmca.2019.3.230-237 (In Russian).
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009;72-75.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver.9.0, 2019. Available at: www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v9.0
- Сафонова Татьяна Борисовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»
- Золотарева Лилия Васильевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»
- Любасовская Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»
- Савинова Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»
- Ананьева Виктория Юрьевна, врач-оториноларинголог, ООО Медицинский центр «Андреевские больницы – НЕБОЛИТ», Сеть семейных клиник

Информация о соавторах:

Сафонова Татьяна Борисовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»

Золотарева Лилия Васильевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»

Любасовская Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии им. академика З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»

Савинова Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования»

Ананьева Виктория Юрьевна, врач-оториноларинголог, ООО Медицинский центр «Андреевские больницы – НЕБОЛИТ», Сеть семейных клиник

Information about co-authors:

Tatyana B. Safonova, MD, PhD., Associate Professor of the of the Z.V.Ermolyeva Department of Microbiology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education

Liliya V. Zolotareva, MD, PhD, DSc, Professor of the Z.V.Yermolyeva Department of Microbiology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education

Lyudmila A. Lyubasovskaya, PhD, MD, Assistant Professor of the Z.V.Yermolyeva Department of Microbiology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education

Tatyana A. Savynova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Pirogov Russian National Research Medical University

Victoria Yu. Ananyeva, otorhinolaryngologist, Medical Centers «Andreevsky Hospitals – NEBOLIT» LLC, Network of family clinics

Конструирование мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии

В.И.Дятлова

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

Бруцеллез – это широко распространенное в мире зоонозное заболевание, поражающее как животных, так и человека. Вакцинация является одной из мер по борьбе с распространением данной инфекции. Использование новых биоинформационных подходов к разработке вакцин может позволить получить безопасный и эффективный препарат в короткие сроки. В нашей работе мы создали прототип мультиэпитопной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии. Она содержит эпитопы для цитотоксических и хелперных Т-клеток, В-эпитопы, 2 адъювантные молекулы, разделенные линкерами, и специфический таг. В ходе исследования были оценены физико-химические, антигенные и другие свойства вакцины. Создана трехмерная модель белка, с помощью которой предсказана способность связывания и динамическое поведение вакцины с рецепторами иммунных клеток.

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

Для цитирования: Дятлова В.И. Конструирование мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии. Бактериология. 2023; 8(4): 14–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-14-27

Construction of multiepitope subunit vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods

V.I.Dyatlova

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

Brucellosis is a widespread zoonotic disease worldwide, affecting both animals and humans. Vaccination is one of the measures to combat the spread of this infection. The use of new bioinformatic approaches to vaccine development can make it possible to obtain it safe and effective in a short time. In our work, we created a prototype of a multi-epitope vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods. It contains epitopes for cytotoxic and helper T cells, B epitopes, 2 adjuvant molecules separated by linkers and a specific tag. The study assessed the physicochemical, antigenic, and other properties of the vaccine. A three-dimensional protein model was created, which was used to predict the binding ability and dynamic behavior of the vaccine with immune cell receptors.

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

For citation: Dyatlova V.I. Construction of multiepitope subunit vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods. Bacteriology. 2023; 8(4): 14–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-14-27

Пандемия COVID-19 показала, что иммунизация является одной из наиболее эффективных мер по охране общественного здоровья. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, она позволяет спасти ежегодно до 3 млн жизней [1]. Кроме того, вакцинация, наряду с другими методами профилактики инфекционных заболеваний, позволяет существенно сократить расходы государства на здравоохранение, повысив при этом качество жизни населения.

Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 26
Телефон: (4967) 36-0003

Статья поступила 14.11.2023, принята к печати 25.12.2023

Бруцеллез является одним из заболеваний, наносящих существенный экономический урон в сельском хозяйстве; он связан не только с заболеванием и гибелью животных, но и с запаздыванием диагностики у людей из-за подострого начала, неспецифической клинической картины и, как следствие, хронизации инфекции и инвалидизации контактных лиц. Вакцинация традиционными живыми аттенуированными вакцинами позволяет ограничить распространение заболевания, однако обладает и недостатками, включая остаточ-

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, Researcher of the Department of Particularly Dangerous Infections of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 26 «Quarter A» territory, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

The article was received 14.11.2023, accepted for publication 25.12.2023

ную вирулентность, осложнение диагностики и ряд противопоказаний к применению [2].

Использование новых биоинформационных подходов к разработке вакцин позволит не только избежать указанных недочетов, но и заранее предсказать эффективность вакцин, а также существенно сократить время и средства при их создании, производстве и тестировании [3].

Применение обратной вакцинологии (ОВ) при выборе вакцины-кандидата против различных целевых бактериальных и вирусных патогенов признано во всем мире. Первой лицензированной вакциной, созданной с помощью методов ОВ, была вакцина против *Neisseria meningitidis* серогруппы B (Bexsero, GSK Vaccines) [4], которая успешно применяется на практике уже много лет. В настоящее время находятся на различных стадиях разработки вакцины против SARS-CoV-2, *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* и других инфекций [5].

В связи с низкой иммуногенностью моновалентных вакцин все большую популярность приобретает подход конструирования мультиэпитопных вакцин (МЭВ), включающих эпитопы различных иммунодоминантных белков патогена, перекрывающих большой спектр иммунных реакций и уменьшающих вероятность гомологии цельного белка микроорганизма с белками человека. Эти вакцины, как правило, включают антигенные детерминанты как клеточного, так и гуморального иммунитета, а также адъювантные молекулы в составе одного синтетического или рекомбинантного белка. При конструировании и прогнозировании эффективности МЭВ используется большое количество компьютерных программ и баз данных, включающих различные алгоритмы расчета, позволяющие поэтапно проводить отбор компонентов вакцины и оценку их качества. Применение биофизических подходов при разработке вакцин *in silico*, таких как молекулярный докинг и анализ молекулярно-динамического моделирования, позволяет предсказать способность связывания и динамическое поведение вакцины с рецепторами иммунных клеток.

В последние годы было предпринято несколько попыток создания МЭВ против бруцеллеза методами ОВ (на основе эпитопов белков *Brucella* Omp19, Omp22, Omp28, Omp31,

BLS, DnaK, L7/L12 и других), однако ни одна из них не была реализована и не прошла клинические испытания [6, 7].

Целью данного исследования являлось конструирование прототипа новой мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза методами обратной вакцинологии (ОВ).

Материалы и методы

Для анализа были использованы последовательности протеомов 10 штаммов бруцелл: *Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941 (UP000000540), *B. abortus* 2308 (UP000002719), *B. abortus* 544 (UP000013221), *B. abortus* str. 63/75 (UP000028790), *B. melitensis* bv. 3 str. *Ether* (UP000028783), *B. melitensis* biotype 1 (str. 16M / ATCC 23456) (UP000028788), *B. melitensis* bv. 2 str. 63/9 (UP000028806), *B. suis* biovar 1 (strain 1330) (UP000029041), *B. suis* (Thompson) (UP000029006), *B. canis* (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) (UP000001385), а также человека (*Homo sapiens* (UP000005640)), мыши (*Mus musculus* (UP000000589)), крупного рогатого скота (*Bos taurus* (UP000009136)), козы (*Capra hircus* (UP000291000)), овцы (*Ovis aries* (UP000002356)), свиньи (*Sus scrofa* (UP000008227)) и собаки (*Canis lupus familiaris* (UP000002254)), полученные в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/teomes>).

Этапы работы по конструированию и валидации МЭВ указаны на рис. 1.

Выбор белка и предиктивная оценка его свойств с помощью методов обратной вакцинологии

Отбор кандидатных бруцеллезных белков проводился методами ОВ, как было описано ранее [8]. С помощью анализа протеома штамма *B. abortus* bv. 1 str. 9-941 (UPID: UP000000540) программой PSORTdb4.0 (<https://db.psort.org>) был предсказан ряд поверхностных бруцеллезных белков, для которых с помощью 24 компьютерных программ была проведена предиктивная оценка их физико-химических, антигенных, иммуногенных и других свойств, а также определен уровень гомологии с белками человека и его микробиоты. Для белков с лучшими вычисленными показателями в ходе биоинформатического анализа, а также белков, выбран-

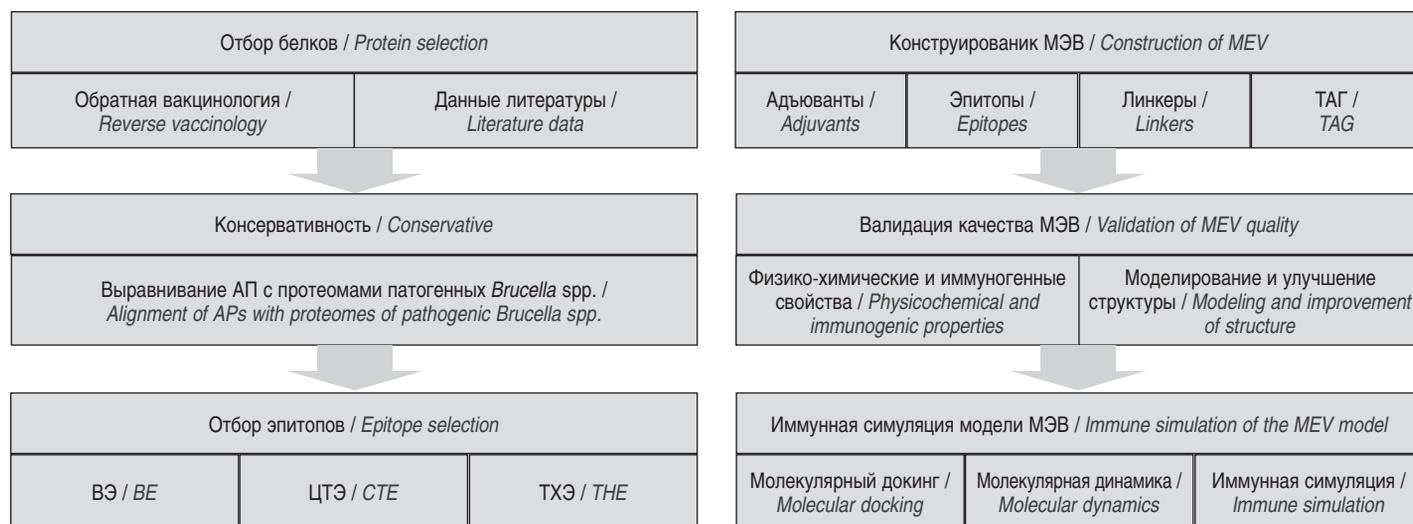


Рис. 1. Этапы конструирования и валидации МЭВ.
 Fig. 1. Stages of design and validation of MEV.

ных по результатам анализа литературы, было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей (АП) с протеомами 10 штаммов патогенных для человека видов бруцелл в программах Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/>) и BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Прогнозирование и оценка эпитопов для целей включения в состав вакцины против бруцеллеза

Для целей конструирования МЭВ с помощью программного обеспечения рассчитывали Т- и В-клеточные эпитопы в составе отобранных бруцеллезных белков. Среди Т-эпитопов отдельно определяли CD8⁺ Т-эпитопы (ЦТЭ), активирующие цитотоксические Т-лимфоциты, и CD4⁺ Т-эпитопы (ТХЭ), активирующие Т-хелперы. Отбор Т-эпитопов из бруцеллезных белков проводился с учетом полиморфизма главного комплекса гистосовместимости (МНС) на территории Российской Федерации (РФ). С помощью базы данных частот аллелей (Allele Frequencies Net Database/AFND) (<http://www.allelefrequencys.net/>) были отобраны наиболее часто встречающиеся аллели HLA класса I (A*(01, 02, 03, 11, 24, 30), B*(07, 08, 13, 15, 18, 35, 40, 44, 49, 51), C*(03, 04, 06, 07, 08, 12))) и II (DRB1*(01, 04, 07, 11, 12, 13, 15), DQA1*(01, 02, 03, 05), DQB1*(02, 03, 05, 06), DPA1*(01), DPB1*(02, 04)) у населения в 53 субъектах РФ, выборка составила 15 490 человек. С помощью компьютерных программ определялись ЦТЭ и ТХЭ, имеющие высокое сродство связывания к каждому из отобранных человеческих лейкоцитарных антигенов HLA класса I и II соответственно, затем определялись дополнительные характеристики, косвенно указывающие на высокую степень вероятности активации Т-клеточного рецептора выбранными эпитопами в комплексе пептид/МНС.

В-клеточные рецепторы распознают не только линейные, но и конформационные эпитопы, поэтому для вычисления В-эпитопов (ВЭ) в качестве исходных данных использовались не только аминокислотные последовательности белков, представленные в формате FASTA (база данных UniProt), но также последовательности структур бруцеллезных белков, определенные как кристаллографией (RCSB Protein Data Bank/RCSB PDB) (<https://www.rcsb.org/>), так и вычисленные компьютерным анализом (AlphaFold Protein Structure Database/AlphaFoldDB) (<https://alphafold.com/>), сохраненные в формате PDB. ВЭ вычислялись с помощью нескольких серверов с учетом таких свойств пептидов, как гидрофильность, гибкость, доступность, полярность, экспонирование на поверхности, антигенность и наличие поворотов, и ранжировались по величине комбинированной оценки.

Предсказанные ЦТЭ, ТХЭ, ВЭ с лучшими ранговыми оценками подвергались дополнительному скринингу. С помощью методов биоинформатики рассчитывались физико-химические свойства (молекулярная масса, изоэлектрическая точка (pI), заряд, индекс нестабильности, алифатический индекс, среднее значение гидропатии (GRAVY), (ProtParam (<https://web.expasy.org/>), значения гидрофобности, гидрофильности (Peptide2 (<https://www.peptide2.com/>), Proteomics tools (<http://www.innovagen.com/>)), консервативность для белка (Epitope Conservancy Analysis (<http://tools.iedb.org/>), растворимость (SolPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>)), иммуногенные свойства пептидов (иммуногенность (Class I

Immunogenicity, CD4episcore (<http://tools.iedb.org/>), антигенность (ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/>), аллергенность (AlgPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/>), AllerCatPro 2.0 (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>), AllerTOP v.2.0, (<http://www.ddg-pharmfac.net/>), токсичность (ToxDL (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/>), ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/>)), вероятность индукции провоспалительного (PIP-EL (<http://www.thegleelab.org/>)), противовоспалительного ответов (PreAIP (<http://kurata14.bio.kyutech.ac.jp/>)), γ -интерферон (ИФН- γ), интерлейкины ИЛ-1, -4, -6, -10, синтез антител классов А, G, Е (IFNepitope, IL2Pred, IL4Pred, IL-6Pred, IL10Pred, IL-13Pred, IgPred (<https://webs.iitd.edu.in/>)), отсутствие гомологии (с белками человека, микробиоты кишечника человека (HMMER 3.4 (<https://www.ebi.ac.uk/>), PBIT (<http://www.pbit.bicnirrh.res.in/>), (Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), BLASTp, порог идентичность >50%, покрытие >50%, E-значение <0,005), а также степени покрытия внутривидового полиморфизма HLA при применении выбранных эпитопов (CD4episcore, Population Coverage (<http://tools.immuneepitope.org/>), NetCTLpan-1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>)).

В качестве наиболее вероятных кандидатов на включение в состав МЭВ рассматривались неаллергенные, нетоксичные, негомологичные белкам человека и животных пептиды с максимальными показателями иммуногенности, антигенности, связывающие наибольшее число аллельных вариантов антигенов HLA, обладающие гидрофильностью, высокой растворимостью, а также рядом других показателей.

Вычисление эпитопов для цитотоксических Т-лимфоцитов

ЦТЭ, длиной 9 аминокислотных остатков (aa), в белковых последовательностях предсказывали с помощью серверов NetMHCpan-4.1.a. (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) и MHC-I Binding Predictions v.2.24 (<http://tools.immuneepitope.org/>), где пептиды, имеющие сродство к антигенам HLA класса I (часто встречающихся на территории РФ аллелей), с ранговой оценкой <0,5% определялись как «сильные связывающие» эпитопы и отбирались для дальнейшего анализа. В программах NetCTLpan 1.1, MHC-I Processing Predictions (<http://tools.immuneepitope.org/>), T cell class I (<https://nextgen-tools.iedb.org/>) вычислялась комбинированная оценка для каждого пептида, включающая аффинность связывания с молекулами HLA I (порог концентрации полумаксимального ингибирования IC50 <50 нМ для сильно связывающих, 50–500 нМ для средне связывающих HLA I эпитопов), эффективность протеасомального расщепления С-конца пептида (>0,225) и его транспорта антигена транспортером, связанным с процессингом белкового комплекса (TAP) (>0,05). Среди ТЦЭ с полученной ранговой оценкой <1,0% (NetCTLpan 1.1) или эпитопов с общей оценкой >0 и IC50 <200 нМ (T cell class I) проводился отбор пептидов на основе прогноза их физико-химических и иммуногенных свойств, гомологии с белками человека, а также с учетом общего числа антигенов HLA I, к которому имеет сродство эпитоп.

Прогнозирование эпитопов для Т-хелперов

ТХЭ, длиной 15 aa, в белковых последовательностях предсказывали с помощью серверов NetMHCIIpan 4.0 ([16](https://</p></div><div data-bbox=)

services.healthtech.dtu.dk/) и MHC-II Binding Predictions (<http://tools.immunepitope.org/>), где пептиды, имеющие сродство к антигенам HLA класса II (часто встречающихся на территории РФ аллелей), с ранговой оценкой (Rank_EL) <1% определялись как сильные, а 1–5% – как слабые связывающие эпитопы. Также учитывался показатель прогнозируемого сродства связывания IC50 (<50нМ) и ранг сродства по сравнению с набором из случайных природных пептидов (Rank_BA <1). Среди данных эпитопов с помощью программ, указанных выше, исключались аллергены, токсичные пептиды, гомологи белков человека и микробиоты кишечника, неантигены (оценка Vaxijen <0,4), пептиды с низкой иммуногенностью (комбинированная оценка CD4eriscore с учетом сродства к 7 вариантам HLAII). Для оставшихся эпитопов оценивалась вероятность продукции цитокинов иммунными клетками после активации рецепторов комплексом пептид/HLA II. Отбирались ТХЭ преимущественно с гидрофильными свойствами, растворимые в воде, с учетом максимального охвата аллель-специфических вариаций рестрикции эпитопов к HLA II.

Прогнозирование В-клеточных эпитопов

Линейные В-эпитопы бруцеллезных белков рассчитывались с помощью программ Vsepred, IgPred, ABCpred, Lbtope (<https://webs.iitd.edu.in/>), SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/>), BepiPred-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>), с пороговыми значениями оценок (score), установленными по умолчанию. Конформационные В-эпитопы определялись с помощью программы ElliPro (<http://tools.iedb.org/>), баз данных RCSB PDB и AlphaFoldDB. Для ВЭ с наиболее высокими ранговыми оценками рассчитывались дополнительные параметры, указанные выше. ВЭ, не имеющие гомологии с белками человека, с оптимальными значениями физико-химических и иммуногенных показателей отбирались для включения в МЭВ.

Конструирование МЭВ

В состав МЭВ включались Т- и В-клеточные эпитопы с лучшими оценочными показателями, разделенные линкерами (KK для В-эпитопов, AAY – для ЦТЭ, GPGPG – для ТХЭ, EAAAK – для адъювантов, HEYGAEALERAG – между ТЦЭ и ТХЭ, RVRTT – перед полигистидиновым тагом), а также адъювантные последовательности на N-конце, полигистидиновый таг на C-конце полипептидной цепи.

Предсказание физико-химических и иммуногенных свойств МЭВ

С помощью компьютерных программ рассчитаны следующие характеристики МЭВ: молекулярная масса, аминокислотный состав, заряд, pI, коэффициент молярной экстинкции, заряд белка, индекс нестабильности, алифатический индекс, GRAVY, время полужизни белка при экспрессии в *E. coli*, дрожжах, клетках млекопитающих (ProtParam), растворимость (SOLpro, Protein-Sol, Innovagen, CCSOL), антигенность (VaxiJen v.2.0, ANTIGENpro), протективность (Vaxign-ML (<https://violinet.org/>)), аллергенность (AllerTOP v.2.0, AllergenFP v.1.0, AlgPred2), токсичность (ToxDL, ToxinPred2), общая иммуногенность белков (Class I Immunogenicity IEDB).

Прогнозирование структуры МЭВ

Вторичная структура МЭВ

Вторичная структура МЭВ вычислялась с помощью программ PSIPRED (<http://www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/>), SSpro8 (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>), RaptorX Property (<http://raptorx2.uchicago.edu/>). Прогнозировалось расположение основных структур (8 классов: 310-, α -, π -спирали, β -лист, β -мост, поворот, изгиб, катушка), полярных молекул, неупорядоченных участков (DISOPRED3).

Моделирование третичной структуры МЭВ, структурные улучшения и валидация качества модели

Моделирование третичной структуры белка выполнено в программах RoseTTAFold (<https://robetta.bakerlab.org/>), IntFOLD (<https://www.reading.ac.uk/>), I-TASSER (<https://zhanglab.dcm.med.umich.edu/>). Оценка качества моделей проводилась в программах MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), SAVES v6.0 (ERRAT, VERIFY, PROCHECK) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/>), Structure Assessment (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Улучшения качества модели осуществляли в программах GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/>), 3Drefine (<https://3drefine.mu.hekademeia.org/>), ReFOLD3, ModFOLD9 (<https://www.reading.ac.uk/>), ModRefiner (<https://zhanggroup.org/>), PREFMD (<https://feig.bch.msu.edu/>). 3D-модели визуализировали с помощью программы ChimeraX (<https://www.rbvi.ucsf.edu/>).

Минимизация энергии МЭВ

Энергетическую минимизацию с помощью силового поля выполняли в программе YASARA Energy Minimization Server (<http://www.yasara.org/>), где корректировались цис-пептидные связи и неправильные изомеры боковой цепи. Минимизация останавливалась, как только энергия снижалась менее чем на 0,05 кДж/моль на атом в течение 200 шагов. Показатель энергии в программе представляет собой сумму энергии силового поля (исключая воду) и неявной энергии сольватации (метод быстрых граничных элементов) и демонстрирует то, на сколько стандартных отклонений качество структуры отличается от типичной рентгеновской структуры с высоким разрешением.

Определение конформационных эпитопов

Конформационные В-эпитопы вычислялись в программе ElliPro (<http://tools.iedb.org/>), учитывались пептиды с оценочным показателем >0,5.

Иммунная симуляция МЭВ

Молекулярный докинг МЭВ с иммунными рецепторами

Молекулярный докинг модели МЭВ со структурами TLR-1,2,3,4,6, HLA-A*02:01 и HLA-DRB1*01:01 осуществлялся в программах ClusPro2 (<https://cluspro.org/>), HawkDock (<http://cadd.zju.edu.cn/>) и HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) в три последовательных этапа: стыковка твердых тел, кластеризация структур с наименьшей энергией и структурные улучшения за счет минимизации энергии. Модели ранжировались по наименьшему энергетическому рейтингу и макси-

мальному числу точек стыковки. Для анализа отбирались в большинстве случаев модели с наименьшим рангом, учитывающая сбалансированный оценочный показатель.

Симуляция молекулярной динамики стыковочного комплекса

Динамическое моделирование проводилось для определения стабильности белкового комплекса МЭВ/TLR-4 в различных термобарических условиях. Для этого первоначально выполнялась минимизация энергии прогнозируемой вакцины в программе YASARA Energy Minimization Server. На сервере PRODIGY (<https://bianca.science.uu.nl/>) определялись прогнозируемые аффинность связывания (свободная энергия Гиббса (ΔG)) комплекса, константа диссоциации (Kd), количество и тип межмолекулярных контактов в пределах предельного расстояния 5,5 Å, доля заряженных и неполярных аминокислот на невзаимодействующей поверхности.

Моделирование молекулярной динамики комплекса МЭВ/TLR-4 проводили в программе MDWeb (<https://mmb.irbbarcelona.org/>). Метод моделирования основан на хорошо известных программах, таких как Amber, NAMD и Gromacs, а также включает ряд инструментов анализа траекторий. В MDWeb определяются недостатки структуры, такие как альтернативное местоположения остатка, разрывы последовательности, столкновения атомов, неправильная хиральность, необычная конфигурация цис-пептидных связей, дисульфидные связи, вставки, структуры, содержащие нуклеиновые кислоты, металлы, лиганды.

Анализ нормальной моды (normal mode analysis/NMA) проводили на сервере iMODS (<https://imods.iqfr.csic.es/>), осу-

ществляющем расчет вероятных движений комплекса на основе специализированных параметров, включая В-фактор, среднеквадратичное отклонение позиции атомов (RMSD), деформируемость комплекса, значения ковариации и упругости модели, обеспечивающие минимизацию энергии, молекулярную стабильность и подвижность атомов.

Также использовался веб-инструмент для анализа гибкости белков FlexServ (<https://mmb.irbbarcelona.org/>), включающий в себя протоколы для вычисления динамики белков (определение базового геометрического анализа, В-фактора, существенную динамику, анализ жесткости, меры коллективности, индексы Линдемманна, корреляцию остатков, цепную корреляцию, определение динамической области, обнаружение шарнирных точек) с использованием 3 типов моделирования, включающих анализ нормального режима, броуновскую и дискретную динамику.

В программе MDdMD (<https://mmb.irbbarcelona.org/>) проводили поиск путей конформационного перехода комплекса с помощью дискретного молекулярно-динамического моделирования, основанного на сочетании методов существенной динамики и методов выборки Максвелла–Демона.

Симуляция иммунного ответа против МЭВ

Программа C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/>) использовалась с целью компьютерного иммунологического моделирования клеточных и гуморальных реакций, возникающих против антигенной вакцины. Сервер использует антигенные пептидные последовательности и рецепторы лимфоцитов для имитации иммуногенных ответов. В этом исследовании применялся стандартный клинический протокол с четырехнедельным периодом между двумя дозами для проведения

Таблица 1. Предсказанные эпитопы бруцеллезных белков для ТЦЭ
 Table 1. Predicted CTL epitopes of brucella proteins

Название / Title	Пептид / Peptide	Начало, aa / Beginning, aa	Белок (UniProt) / Protein (UniProt)	ГП / HP	Протеос. / Proteos	TAP / TAP	ИМ / IM	АГ / AG	N HLAI	HLAImax	Аффинность / Affinity	IC50
Ц1	AERLAVEAW	189	Q57FW8	0,11	1,4	0,46	0,19	0,78	3	B44	0,97	15,7
Ц2	FQSDDNFQV	439	Q2YR58	-0,94	1,1	0,12	0,02	0,6	6	A2	0,89	7,5
Ц3	GAYGYRLYK	3049	A0A0H3GGE2	-0,83	0,8	0,27	0,07	1,15	4	A11	0,92	5,2
Ц4	IPFDDISGY	468	Q2YR58	0,08	1,3	1,18	0,09	0,55	7	B35	0,99	6,2
Ц5	KEIGWTPSL	435	A0A7U8PLF0	-0,39	1,5	0,48	0,22	0,82	6	B40	0,99	8,2
Ц6	RLSAGFDVF	498	Q2YRQ2	0,69	1,4	1,14	0,17	0,97	2	B15	0,72	13
Ц7	RPVRGRRGL	673	Q57DM9	-1,38	1,4	0,37	0,21	0,98	1	B7	0,98	3,5
Ц8	RVRARALAL	16	Q2YNI2	0,41	1,5	0,51	0,16	0,96	6	B7	0,91	5,4
Ц9	YAMRATLVY	119	A0A0H3GGE2	0,63	1,5	1,28	0,08	0,52	9	B35	0,99	2,1
Ц10	YRFNESVRL	621	Q2YIK8	-0,81	1,6	0,50	0,03	0,6	2	C6	0,96	16,5
Ц11	YFDLNFYRF	367	Q57E55	-0,21	1,4	1,01	0,16	2,3	7	C4	0,94	39

ИМ – иммуногенность, АГ – антигенность, HLAImax – антиген с наибольшим сродством к пептиду, Протеос. – прогноз протеосомального С-терминального расщепления пептида; TAP – показатель эффективности связывания с TAP; IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования; жирным выделены «индукторы» ИФН-γ; подчеркнуты пептиды, растворимые в воде, сд – содержащий домен.

IM – immunogenicity, AG – antigenicity, HLAImax – antigen with the highest affinity for the peptide, Proteos. – prediction of proteasomal C-terminal cleavage of the peptide; TAP – an indicator of the efficiency of binding to TAP; IC50 – concentration of half-maximal inhibition; “inducers” of ИФНγ – highlighted in bold; Water-soluble peptides with a CD-containing domain are underlined.

Таблица 2. Предсказанные эпитопы бруцеллезных белков для Т-хелперов
 Table 2. Predicted Th epitopes of brucella proteins

Название / Title	Пептид / Peptide	Белок (UniProt) / Protein (UniProt)	Начало, aa / Beginning, aa	ГП / HP	ИМ / IM	АГ / AG	N HLAII	HLAIImax	Аффинность / % ранг / Affinity / % rank
Tx1	VKAEYDFQRFNDVKS	Q93SI4	174	-1,1	65	0,9	8/ 3	DPA1*1/ DPB1*4	0,89/ 0,01
Tx2	GGIKYFHANSIGADS	A0A0H3G586	420	-0,2	39	0,7	31/ 22	DRB1*15	0,97/ 0,04
Tx3	KTKIRVARDQLAGKE	Q2YLZ4	169	-1,1	47	1,0	31/ 22	DRB1*13	0,79/ 0,67
Tx4	STAIAALNAARADVK	Q57DG8	191	0,4	42	0,8	31/ 21	DQA1*5/ DQB1*6	0,26/ 0,02
Tx5	GGQIKGTASLTVDGG	A0A0H3GGE2	2222	-0,1	61	1,5	30/ 10	DRB1*7	0,97/ 0,02
Tx6	GEDYRPAASFAAYTD	Q2YNJ8	486	-0,7	47	0,6	29/ 21	DRB1*4	0,95/ 0,06
Tx7	LNPNFYQAYANRALV	Q2YIV8	109	-0,2	36	0,6	27/ 17	DRB1*1	0,96/ 0,17
Tx8	KGTYYRVRVQAGSKE	Q2YNJ8	956	-1,2	55	1,2	26/ 15	DRB1*11	0,91/ 0,40
Tx9	AASYRRAGSEAAPAA	Q2YNJ8	611	-0,3	60	0,8	25/ 19	DQA1*1:3/ DQB1*3	0,46/ 0,01
Tx10	QRLVAGGRIDRASVE	Q579L1	390	-0,4	62	0,7	21/ 15	DQA1*5/ DQB1*3	0,9/ 0,04
Tx11	NPQFNGYPARPGKAS	Q2YJ67	46	-1,4	68	0,9	23/ 14	DRB1_1	0,8/ 0,52

ИМ – иммуногенность, АГ – антигенность, N – число связываемых HLAII (слабое/сильное сродство); HLAIImax – антиген с наибольшим сродством к пептиду; жирным выделены «индукторы» ИФН-γ; подчеркнуты пептиды, растворимые в воде.
 IM – immunogenicity, AG – antigenicity, N – number of bound HLAII (weak/strong affinity); HLAIImax – antigen with the highest affinity for the peptide; “inducers” of ИФНγ are highlighted in bold; water-soluble peptides are underlined.

иммунной симуляции разработанной вакцинной конструкции. Для анализа были выбраны наиболее распространенные аллели HLA-A*01:01, 02:01, B*07:02, 13:02, DRB1*01:01, 04:01. Иммуная симуляция проводилась с использованием настроек по умолчанию для 1000 шагов.

Клонирование МЭВ *in silico*. Оптимизация кодонов для экспрессии в системе *E. coli*

С целью клонирования белка в системе *E. coli* в программе Codon Adaptation Tool (<https://www.jcat.de/>) была вычислена и оптимизирована нуклеотидная последовательность гена, выбран вектор для экспрессии с T7 промотором, определены условия культивирования и очистки белка.

Результаты исследования и их обсуждение

Выбор белка и предиктивная оценка его свойств с помощью методов обратной вакцинологии

Методами обратной вакцинологии предсказано 45 поверхностных бруцеллезных белков, имеющих вакцинный потенциал. Кроме того, по данным литературы было отобрано еще 46 бруцеллезных белков, проявляющих протективные свойства в случаях экспериментального бруцеллеза [8]. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей подтвердило консервативность 91 отобранного белка для патогенных для человека видов бруцелл. Большинство отобранных белков относятся к группам транс-

портеров (АТФ-связывающие кассетные транспортеры, автотранспортеры, порины, белки системы секреции IV типа, липополисахарид-сборочные белки, транспортеры гема BhuA), флагеллинов, адгезинов, шаперонов, ферментов, белков семейств OMP25/OMP31, MliC, YadA, OmpP1/FadL и другим. Подробный список использованных белков, аминокислотные последовательности вычисленных эпитопов и их характеристики представлены в базах данных [9, 10].

Прогнозирование и оценка эпитопов для целей включения в состав вакцины против бруцеллеза

С помощью программного обеспечения NetMHCpan-4.1a для 91 белка бруцелл был вычислен ряд ТЦЭ (9 aa), имеющих сродство для антигенов HLA класса I (22 аллелей: HLA-A*01:01, 02:01, 03:01, 11:01, 24:02, 30:01; HLA-B*07:02, 08:01, 13:02, 15:01, 18:01, 35:01, 40:02, 44:02, 49:01, 51:01; HLA-C*03:04, 04:01, 06:02, 07:01, 12:03), из которых 2309 эпитопов были определены как «сильные связывающие». Среди них антигенными свойствами обладали 1306 эпитопов (VaxiJen v 2.0). Далее с помощью трех программ (NetCTLpan 1.1, MHC-I Processing Predictions, T cell class I) был отобран 821 эпитоп, имеющий высокую аффинность связывания с выбранным набором антигенов HLA I, значимые показатели эффективности процессинга и иммуногенности. Дополнительный скрининг эпитопов позволил вычислить 42 нетоксичных, неаллергенных, не имеющих гомологии с белками человека и микробиоты кишечника ТЦЭ, связывающих от 1

Таблица 3. Предсказанные В-эпитопы бруцеллезных белков
 Table 3. Predicted B epitopes of brucella proteins

Название / Title	Пептид / Peptide	Белок (Uniprot) / Protein (UniProt)	Локализация / Localization	Размер (aa) / Size (aa)	Гидроксипатичность / Hydrophobicity	Антигенность / Antigenicity	Растворимость / Solubility
Линейные эпитопы							
B1	ENRTNGGTSE	Q2YNY3	61	10	-2,15	2,6	0,94
B2	VNTHSDSKSKGKGTIERSED	C4IUF4	134	20	-1,68	1,51	0,94
B3	SQKLGNDPEEYRSR	Q576D7	498	20	-2,25	0,93	0,96
B4	KRSFNYIDEENVNIN	Q64JD6	229	15	-1,27	0,82	0,91
Конформационные эпитопы							
Bc1	A:R157,A:G158,A:E159,A:G162,A:T163,A:G164, A:F165	Q2YN33		7	-1,01	1,36	0,99
Bc2	A:R113,A:K115,A:A116,A:K117,A:D118,A:N119,A:T120,A:T121,A:S122,A:A123,A:P124,A:G125,A:W126	Q93SI4		13	-1,6	1,2	0,7
Bc3	A:Q100, A:A101, A:V102, A:K103, A:K104, A:V105, A:A106, A:Q107, A:E108, A:Q109, A:K110, A:R111, A:L112, A:S113, A:D114, A:E115, A:T117, A:K118	Q8YF53		18	-1,49	0,5	0,87
Bc4	A:K31, A:L32, A:P33, A:D34, A:S35, A:V36, A:K37, A:V38, A:A59, A:G60, A:D61	Q57ES7		11	-0,33	0,42	0,84

до 9 антигенов HLA I с высокой аффинностью (IC50 для одного из выбранных HLA I составил от 2 до 39 нМ), с высокими прогнозируемыми показателями протеасомального расщепления (0,83–1,68), транспорта TAP (0,07–1,31), антигенности (0,4–2,3), иммуногенности (0,02–0,47), 12 из которых определены в программе IANPeritope как «индукторы ИФН-γ». Из них для включения в МЭВ было отобрано 11 ТЦЭ с оптимальными физико-химическими показателями (гидроксипатичности (ГП), гидрофобности (ГБ), гидрофильности (ГЛ), заряда, растворимости и других), а также с максимальным числом связываемых HLA I, покрывающих полиморфизм МНС населения РФ (табл. 1).

Прогнозирование эпитопов для Т-хелперов

Скрининг 90 белков с помощью программ NetMHCIIpan 4.1, MHC-II Binding Predictions выявил 2519 и 4640 ТХЭ, сильно связывающих (Rank_EL <1%) 33 антигена HLA II (DRB1*01, 04, 07, 11, 12, 13, 15, DQA1*01:01, 01:02, 01:03, 02:01, 03:01, 05:01/ DQB1*02:01, 03:01, 05:01, 06:02; DPA1*01:03/ DPB1*02:02, 04:01) соответственно. В результате из двух программ было отобрано 1547 ТХЭ (831 с аффинностью связывания IC50 <50нМ и 975 с оценкой связывания >0,9 и процентильным рангом оценки прогнозирования лиганда <0,1). Дополнительный анализ отсортировал из них 699 нетоксичных, негомологичных белкам человека и микробиоты кишечника антигенных пептидов. Затем было отобрано 132 неаллергенных, иммуногенных ТХЭ (комбинированная оценка иммуногенности <68) растворимых пептидов (ГБ, ГП <0, ГЛ >0). На последнем этапе было отобрано 10 ТХЭ, преимущественно прогнозируемых как индукторы провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-6, ИФН-γ), и неиндукторы противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13) с наибольшим числом вариантов связываемых антигенов HLA II (от 21 до 31), компенсирующих полиморфизм МНС в популяции (с учетом отсутствия повторения коровой антигенной последо-

вательности), а также один ТХЭ (Тх1), обладающий сильным сродством преимущественно к 2 вариантам HLA II (DPA1*01:03/ DPB1*02:02, 04:01) (табл. 2).

Предсказание В-клеточных эпитопов

Для 26 поверхностных белков бруцелл было вычислено более 200 линейных и конформационных В-эпитопов. Неаллергенные и нетоксичные пептиды с максимальными показателями антигенности, вероятности растворимости, минимальными значениями гидроксипатичности и отсутствием гомологии с белками человека и микробиоты кишечника человека рассматривались как кандидаты на включение в состав МЭВ. В табл. 3 представлены наиболее перспективные линейные и конформационные В-эпитопы бруцеллезных белков для использования в составе МЭВ.

Конструирование мультиэпитопной вакцины

Была сконструирована МЭВ, 642 аа, включающая 11 ЦТЭ (Тс1-11), 11 ТХЭ (Тх1-11), 8 ВЭ (В1-4, Вс1-4), разделенных линкерами, а также адъювантные молекулы: пептид PADRE (AKFVAAWTLKAAA) и белок большой рибосомной субъединицы bL12 (50S рибосомный белок L7/L12) (UPID:Q2YM14) на N-конце, полигистидиновый таг из 8 остатков гистидина (8H) на C-конце полипептидной цепи. Конструкция МЭВ и ее аминокислотная последовательность представлены на рис. 2.

Предсказание физико-химических и иммуногенных свойств МЭВ

Результаты оценка свойств МЭВ методами биоинформатики представлены в табл. 4. Формула МЭВ – C3014H4729N887O904S2, молекулярная масса белка составила 67,9 кДа, pI = 9,6, согласно расчетам белок определен как высокорастворимый, стабильный в растворе, термостабильный, гидрофильный, неаллергенный, нетоксичный, с высокими показателями антигенности и иммуногенности.

Таблица 4. Валидация свойств МЭВ
 Table 4. Validation of MEV properties

Показатель / Indicator	Значение / Value Score	Оценка / Evaluation	Показатель / Indicator	Значение / Value Score	Оценка / Evaluation
Количество aa / Quantity of aa	642		Аллергенность / Allergenicity	13	Не аллерген / Not allergen
Мм, Да	67919		Аллергенность / Allergenicity	14	Не аллерген / Not allergen
pI	9,64		Токсичность / Toxicity	-0,265	Нетоксичный / Non-toxic
ЧЗО-(D + E) / NCR-(D + E)	71		Токсичность / Toxicity	9x 10-56	Нетоксичный / Non-toxic
ЧЗО+(R + K) / NCR+(R + K)	100		Антигенность / Antigenicity	0,997	Антиген / Antigen
Индекс нестабильности / Instability index	24,19	Стабильный / Stable		0,898	Антиген / Antigen
GRAVY	-0,596	Гидрофильный / Hydrophilic	Вирулентность / Virulence	-0,996	Невирулентный / Non-virulent
Алифатический индекс / Aliphatic index	64,98	Термостабильный / Heat stable	Патогенность / Pathogenicity		Патогенный / Pathogenic
Коэффициент экстинкции M-1 см-1, при 280 нм / Extinction coefficient M-1 cm-1, at 280 nm	69410 75180	Abs 0.1% (= 1 g/l) 1.107	Протективность / Protectiveness	94,4	Протективный / Protective
Растворимость (Вероятность) / Solubility (Probability)	0,851	Растворимый / Soluble	Время полужизни белка E. coli in vivo / Half-life of E. coli protein in vivo	>10 ч	
	0,582	Растворимый / Soluble	Дрожжи in vivo / Yeast in vivo	>20 ч	
Заряд при pH 7 / Charge at pH 7	30,19	Хорошо растворим в воде / Soluble in water	Ретикулоциты млекопитающих in vitro / Mammalian reticulocytes in vitro	>30 ч	
Адгезивность / Adhesiveness	0,42	Не адгезин / Not adhesin	Иммуногенность / Immunogenicity	1,26	Иммуногенный / Immunogenic

aa – аминокислоты; Мм – молекулярная масса, ЧЗО – число заряженных остатков, 1 – SolPro, 2 – Protein-Sol, 3 – AllerTOP v.2.0, 4 – AllergenFP v.1.0, 5 – ToxinPred, 6 – ToxDL, 7 – Vaxijen v.2.0, 8 – AntigenPro, 9 – Innovagen.
 aa – amino acids; Мм – molecular weight, ЧЗО – number of charged residues, 1 – SolPro, 2 – Protein-Sol, 3 – AllerTOP v.2.0, 4 – AllergenFP v.1.0, 5 – ToxinPred, 6-ToxDL, 7 – Vaxijen v. 2.0, 8 – AntigenPro, 9 – Innovagen.

Прогнозирование структуры МЭВ
Вторичная структура МЭВ

Согласно данным компьютерного анализа в программе SSpro8 вторичная структура МЭВ с большой вероятностью содержит 38,4% α-спиралей, 9% β-цепей, 44,2% – беспорядочный клубок, кроме того, содержит такие структуры, как

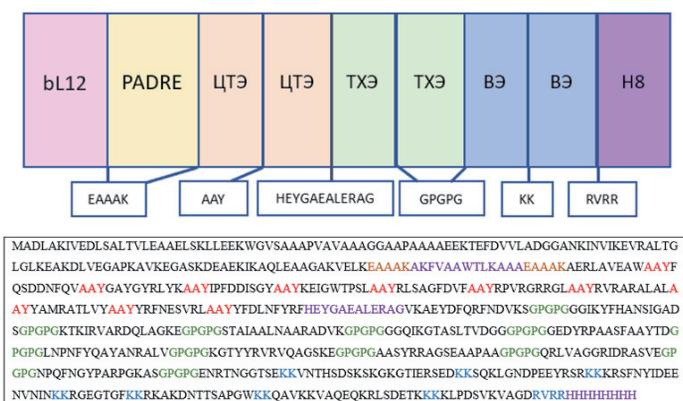


Рис. 2. Конструкция МЭВ и ее аминокислотная последовательность.
 Fig. 2. MEV design and its amino acid sequence.

G-310-спираль, I-пи-спираль, β-мост, T-поворот, S-изгиб. В программе PSIPRED были предсказано расположение основных элементов вторичной структуры, неупорядоченных участков, полярных и гидрофобных аминокислот, а также возможная локализация белка в клетке (рис. 3).

Моделирование третичной структуры МЭВ, структурные улучшения и валидация качества модели

3D-модель МЭВ, полученная в программе RoseTTAFold, имела лучшие значения показателей состоятельности модели в Structure Assessment. Использование трех программ (GalaxyRefine, 3Drefine, ModFOLD9) позволило значительно улучшить качество модели (среднеквадратичное отклонение позиции атомов (RMSD) = 0,84, IDDT = 0,89, TM = 0,99, GDT-TS = 0,96, GDT-HA = 0,85).

На карте Рамачандрана изменились показатели (MolProbity – с 3,16 до 1,56, благоприятные области – с 93,75 до 96,25%, неблагоприятные – с 1,25 на 0,31%, внеслоевые ротамеры – с 0 до 0,66%, плохие связи – с 1 до 0, плохие углы – с 13 до 56). Значения качества модели улучшились после уточнения и минимизации энергии (Errat – с 98,5 до 97,2, VERIFY – с 85,83 до 88,66% остатков со средним бал-

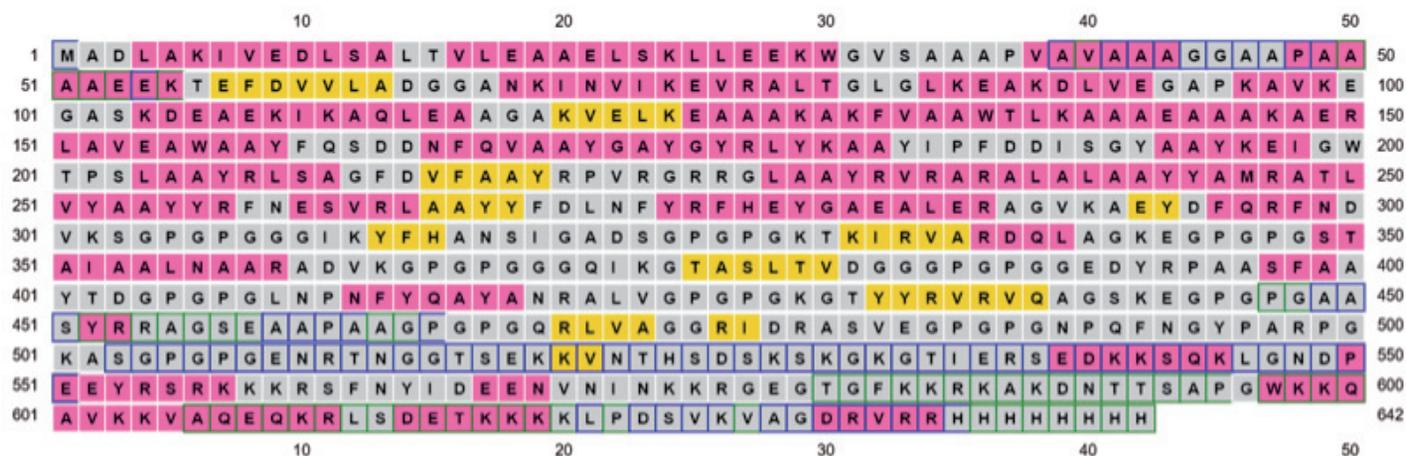


Рис. 3. Прогнозируемая вторичная структура МЭВ.

Розовым выделена α -спираль, желтым – β -лист, серым – беспорядочный клубок, синим – неупорядоченная область, зеленым – участок связывания белка.

Fig. 3. Predicted the secondary structure of MEV.

Pink – α -helix, yellow – β -sheet, gray – random coil, blue – disordered region, green – protein binding site.

лом $3D-1D \geq 0,1$, PROCHECK ошибка 1 предупреждение 6 прошли проверку с 3 до 2, Z-счет – с -8,84 до -8,75, QMEANDisCo Global – с 0,6 до $0,62 \pm 0,05$, C β – с -0,31 на 0,05, All Atom – с -0,47 до -0,33). В целом получены высокие показатели качества улучшенной модели МЭВ (рис. 4).

Минимизация свободной энергии МЭВ

В результате энергетической минимизации в программе YASARA Energy Minimization Server свободная энергия структуры МЭВ уменьшилась с -278877,1 до -365960 кДж/моль, а показатель Z – с -0,75 до -0,63 (рис. 5).

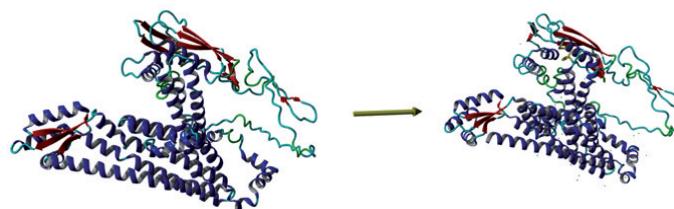


Рис. 5. Минимизация свободной энергии МЭВ.

Fig. 5. Minimization of free energy of MEV.

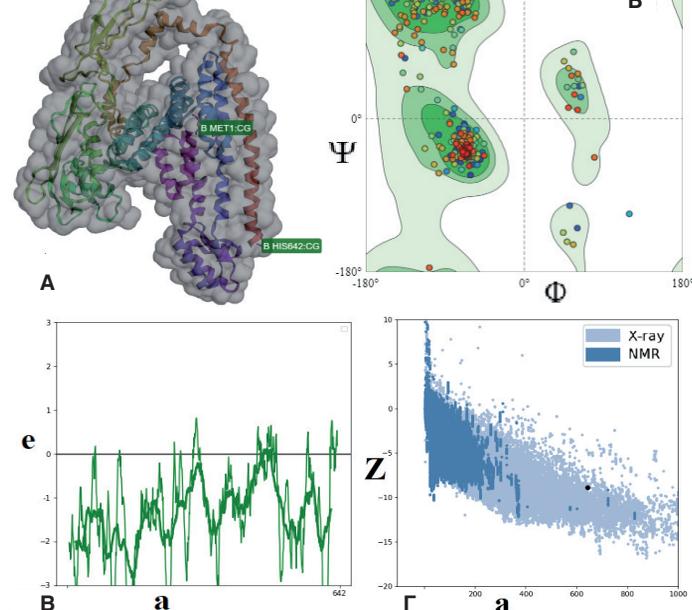


Рис. 4. Оценка качества модели МЭВ: А – 3-D модель МЭВ; Б – карта Рамачандрана; В, Г – графики локального и общего качества модели в ProSA-web: а – аминокислотные остатки, Z – оценочный показатель, е – прогнозируемая энергия.

Fig. 4. Assessment of the quality of the MEV model: A – 3D model of the MEV; Б – Ramachandran map; В, Г – graphs of local and overall quality of the model in ProSA-web: а – amino acid residues, Z – score, е – predicted energy.

Прогнозирование конформационных эпитопов

В программе Ellipro определено 6 конформационных В-эпитопов, размерами от 13 до 74 аа, с оценкой от 0,706 до 0,835. На рис. 6 представлен конформационный ВЭ, размерами 74аа, со значением оценки 0,835.

Иммунная симуляция МЭВ

Молекулярный докинг МЭВ с иммунными рецепторами

В программе ClusPro2 была проведена стыковка моделей МЭВ со структурами TLR-1,2,3,4,6 (PDB ID: 2Z7X, 3A79, 3FX1, 1ZIW, 4G8A), HLA-A* 02:01 (111Y), HLA-DRB1*04:01 (5N19)) и определена минимальная энергия связывания (сбалансированная оценка) и число связей ($E_{3FX1} = -880$; $N = 26$, $E_{4G8A} = -1016$; $N = 100$, $E_{1ZIW} = -1113$; $N = 55$, $E_{3A79} = -1025$; $N = 60$, $E_{2Z7X} = -850$; $N = 53$, $E_{111Y} = -998$; $N = 59$, $E_{5N19} = -935$; $N = 54$). В программе HawkDock (<http://cadd.zju.edu.cn/>) энергия связывания составила для МЭВ с 4G8A: -86,44 ккал/моль; $N_{4G8A} = 386$, $N_{МЭВ} = 642$; с 5N19: -86,21 ккал/моль; $N_{5N19} = 386$, $N_{МЭВ} = 642$; с 111Y: -80 ккал/моль; $N_{111Y} = 768$, $N_{МЭВ} = 642$. На рис. 7 красным выделены связи комплексов МЭВ / иммунный рецептор с наименьшей свободной энергией. Например, пять аминокислот МЭВ (Arg₂₂₆, Arg₂₂₃, Lys₅₇₅, Arg₅₆₀, Tyr₁₅₉) связываются с 5 аминокислотами TLR-4 (4G8A) (Asp₃₇₂, Glu₉₇, Glu₁₅₇, Glu₃₄₇, Glu₁₀₀) в комплексе МЭВ/TLR-4.

Симуляция молекулярной динамики стыковочного комплекса

В результате проведения минимизации энергии комплекса МЭВ/TLR-4 в программе YASARA Energy Minimization Server потенциальная энергия уменьшилась с 56057712,7 до

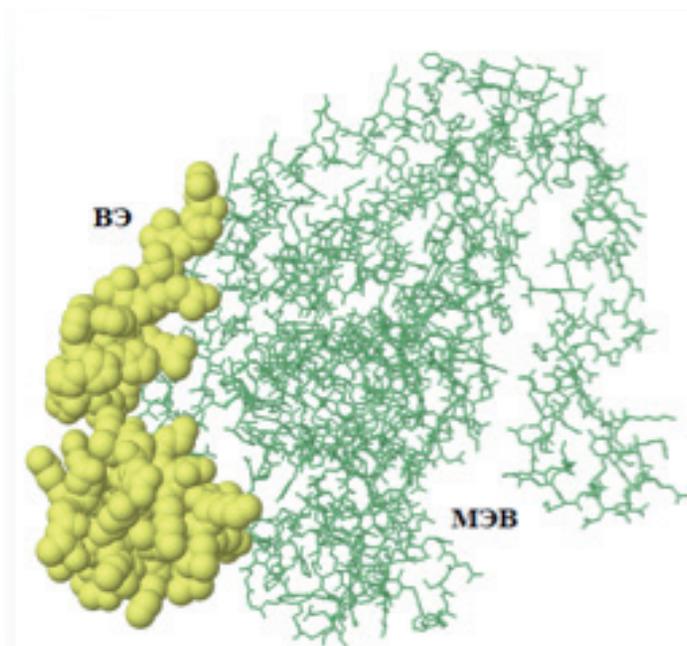


Рис. 6. Прогнозируемый конформационный ВЭ МЭВ.
Fig. 6. Predicted conformational EV of MEV.

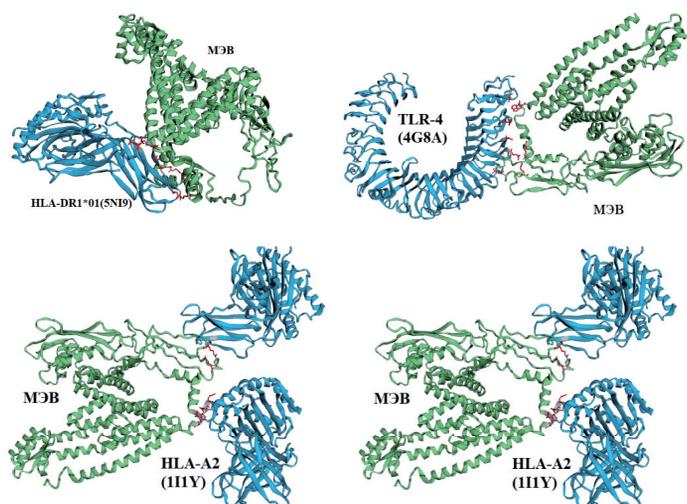


Рис. 7. Молекулярный докинг МЭВ со структурами TLR и HLA: красным обозначены наиболее сильные связи между МЭВ и структурами, А – прогнозируемая энергетически выгодная структура комплекса МЭВ/TLR-4(4G8A).

Fig. 7. Molecular docking of MEV with TLR and HLA structures: The strongest bindings are indicated in red, A – is the predicted energetically favorable structure of the MEV/TLR-4 complex.

-652527,2 кДж/моль, оценка качества улучшилась с 1,96 до -0,94. На рис. 7А представлена визуализация энергетически выгодной трехмерной структуры белкового комплекса после процесса минимизации в программе ChimeraX. На сервере PRODIGY прогнозируемая для комплекса ΔG составила -11,7 ккал/моль, константа диссоциации (Kd) при 25°C – 2,7e-09 моль, 28% заряженных и 40,3% незаряженных остатков на невзаимодействующей поверхности, всего межмолекулярных контактов – 143, из них заряжено-заряженных – 10, заряжено-полярных – 34, заряжено-неполярных – 32. Заряженные остатки обеспечивают термостабильность белков.

Моделирование молекулярной динамики в программе MDWeb не выявило недостатков структуры комплекса МЭВ/

TLR-4, связанных с наличием альтернативного местоположения остатков, разрывов последовательностей, столкновения атомов, неправильной хиральности, необычной конфигурации цис-пептидных связей, вставок, связей с нуклеиновыми кислотами, тяжелыми металлами, лигандами. В ходе анализа в комплексе выявлено 5 дисульфидных связей (A29-A40, A281-A306, A390-A391, A583-A609, A585-A627), стабилизирующих структуру, а также 10 столкновений полярных акцепторов.

Анализ нормальной моды (NMA) был проведен для установления молекулярной стабильности и динамики комплекса МЭВ/TLR-4. Результаты анализа указаны на рис. 8. На графике деформируемости (рис. 8А) наиболее высокие пики указывают на наиболее деформируемые области. График В-фактора (рис. 8Б) демонстрирует связь между мобильностью NMA и комплексом МЭВ/TLR4, представляя собой средние значения RMSD пристыкованного комплекса. На рис. 8Г каждая нормальная мода комплекса представлена индивидуальной (фиолетовый) и кумулятивной (зеленый) дисперсиями. Дисперсия и собственное значение отрицательно коррелировали. Вычисленное собственное значение комплекса 7,19e-06 отражает жесткость движения и связано с энергией, необходимой для деформации конструкции. Плавный процесс деформации поддерживается нижним собственным значением (рис. 8В). Связь между парами остатков отображается на графике ковариации, как показано на рис. 8Д (красный цвет показывает корреляцию, синий цвет – антикоррелированные остатки, а белый цвет связан с некоррелированными движениями). Также была создана специализированная карта эластичной сети, представляющая собой пару атомов, соединенных пружиной в комплексе МЭВ/TLR4. Точки окрашены в соответствии с их жесткостью, более темные серые цвета указывают на более жесткие пружины и наоборот (рис. 8Е). Анализ NMA показал стабильное взаимодействие между TLR-4 и МЭВ.

Анализ гибкости белкового комплекса проводился в веб-инструменте FlexServ, который моделирует структурные колебания, используя как стандартные, так и гауссовские RMSD, форсирует молекулы, усиливая выравнивание жестких фрагментов и благоприятствуя размещению движений в гибких областях. При анализе дискретной динамики комплекса были вычислены показатели существенных деформационных движений: профили В-фактора, индекс «коллективности» (0,356/0,283Å), размерность, дисперсионный профиль (общая дисперсия 3974/4265Å², процент отраженной дисперсии 90%), размер существенного пространства (162/164 собственных значений), индекс Линдемманна (0,266/0,267Å, все в жидкой фазе). Для определения остатков, вокруг которых создаются наибольшие колебания белка, была проведена детекция шарнирных точек (рис. 9). На рис. 9А наиболее подвижные области обозначены красным цветом. На рис. 9Б показан график анализа структуры методом изменения уклона В-фактора, где низкие значения показателя указывают на фиксированные области, переход к восходящим значениям (гибким доменам) обозначен зеленым, к низким значениям – красным. На рис. 9В представлен график путей конформационного перехода комплекса, составленный с помощью дискретного молекулярно-динами-

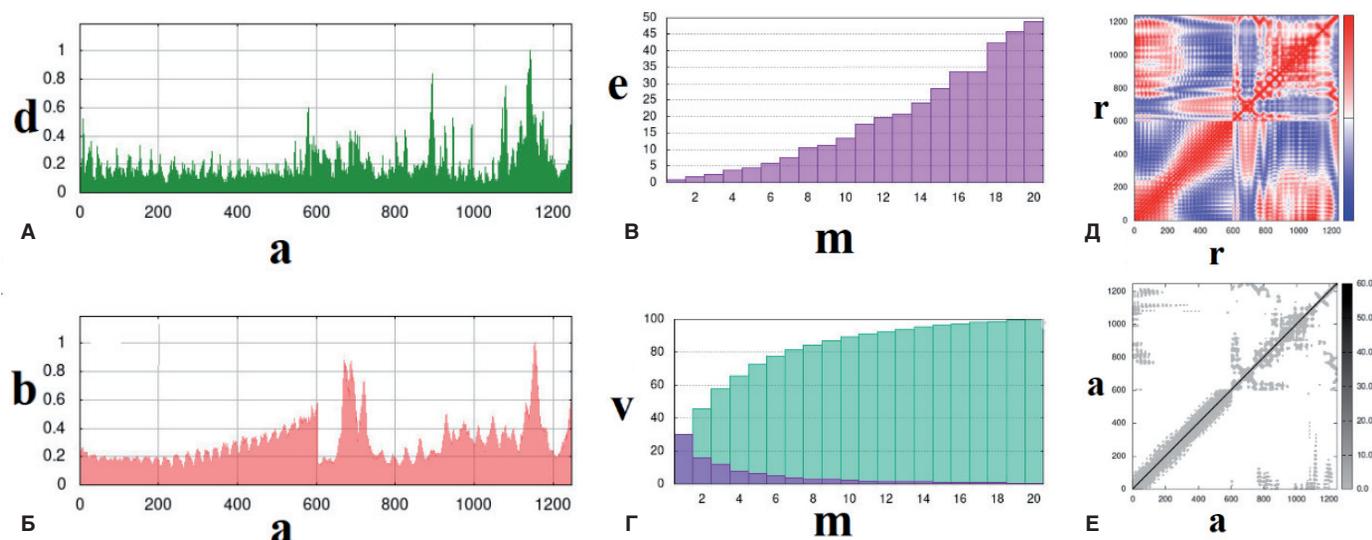


Рис. 8. Анализ нормальной моды: А – график деформируемости, Б – график В-фактора, В – график собственного значения, Г – график дисперсии, Д – ковариационный график корреляции остатков, Е – график эластичности модели, а – атомный индекс, б – В-фактор, d – деформируемость, e – собственное значение, m – индекс моды, r – индекс остатка, v – дисперсия.

Fig. 8. Normal mode analysis: A – deformability graph, Б – B-factor graph, B – the eigenvalue specifies the motion stiffness linked to each normal mode, Г – the variance map, Д – covariance graph of residual correlation, E – elastic network model, a – atomic index, b – B-factor, d – deformability, e – eigenvalue, m – mode index, r – residue index, v – variance.

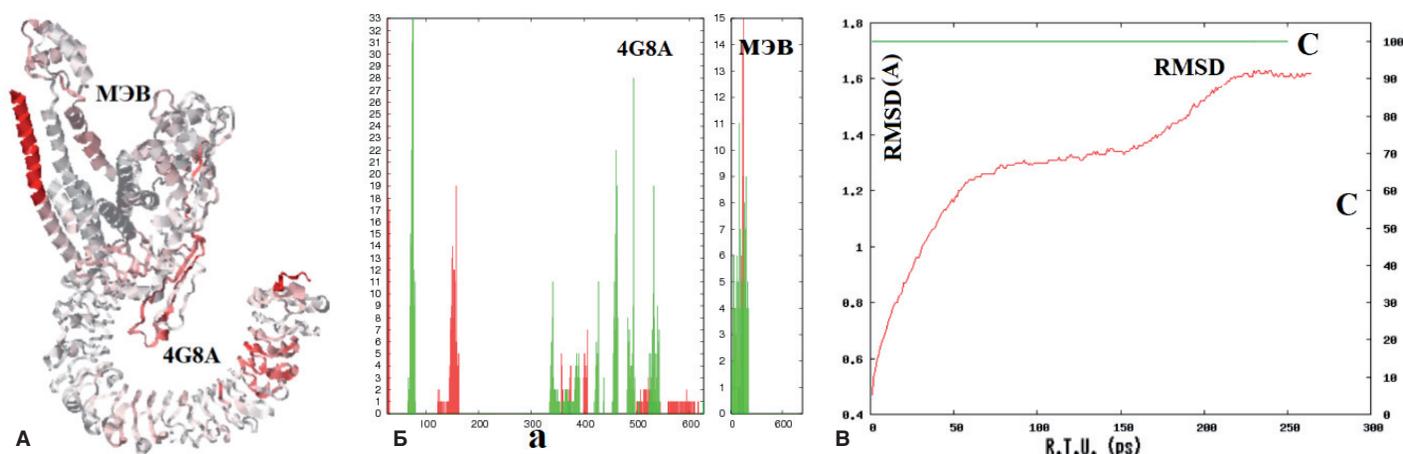


Рис. 9. Симуляция молекулярной динамики комплекса МЭВ/TLR-4: А – изображение динамики МЭВ, Б – график анализа методом изменения уклона В-фактора (по вертикали обозначены оценочные показатели), В – график путей конформационного перехода комплекса, а – аминокислотные остатки, С – допущение.

Fig. 9. Simulation of molecular dynamics of the MEV/TLR-4 complex: A – image of MEV dynamics, B – graph of analysis using the method of changing the slope of the B-factor (eigenvalues are indicated vertically), B – graph of the conformational transition paths of the complex, a – amino acids residuals, C – acceptance.

ческого моделирования в программе MDdMD. В целом структура белкового комплекса достаточно стабильна и не обладает выраженной гибкостью.

Иммунная симуляция МЭВ

Результаты иммунного моделирования в программе C-ImmSim показали значительное увеличение первичных и вторичных иммунных ответов против предложенной вакциной конструкции (рис. 10). После введения вакцины наблюдались высокие уровни антител IgG1, IgM, IgG, что свидетельствует о пролиферации иммунных ответов (рис. 10А). Увеличение популяции В-клеток было очевидным после повторного воздействия антигенной вакцины, что приводило к развитию гуморальной иммунной памяти (рис. 10В). Популяция цитотоксических (ТЦ) и хелперных Т-клеток (ТХ)

увеличивалась при существенном уменьшении популяции антигенов во время вторичного и третичного иммунного ответа (рис. 10 Г–Е). Это указывает на повышенную способность предлагаемой модели вакцины к адаптивному иммунитету. Прогнозируется преобладание Th1 ответа на МЭВ. Более того, было предсказано, что развитие естественных клеток-киллеров, дендритных клеток и макрофагов будет поддерживать рост после каждой иммунизации. В случае предложенной конструкции достоверно повышенные уровни цитокинов и интерлейкины, включая ИФН- γ , трансформирующий ростовой фактор β -1 (ТФР β 1), ИЛ-2, были предсказаны после непрерывного воздействия антигена во время периодов иммунизации, в то время как другие цитокины обнаруживают более низкие концентрации (рис. 10Б). Индекс Симпсона (общий сигнал опасности, D) оказался нормаль-

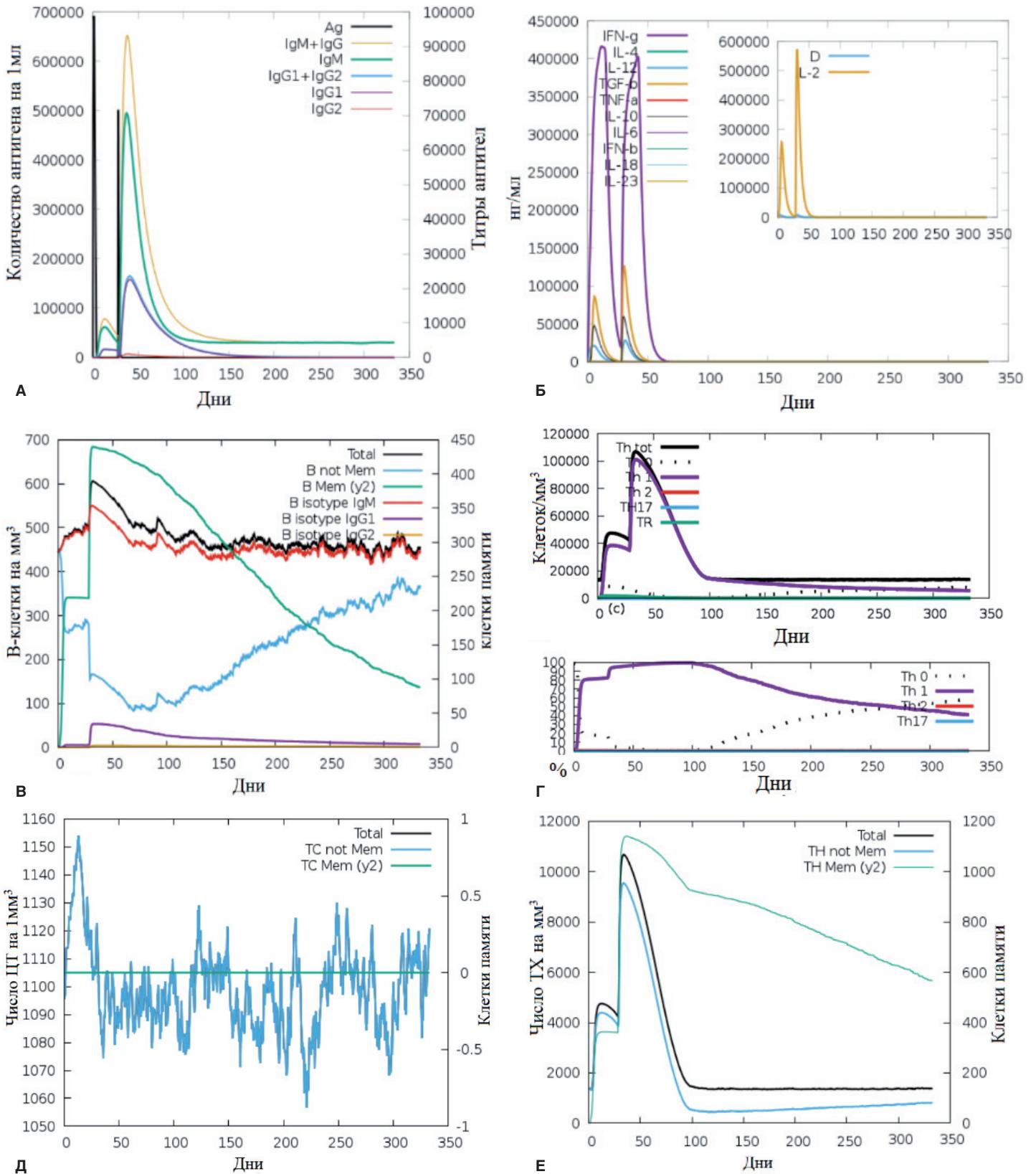


Рис. 10. Иммуная симуляция МЭВ: А – график гуморального ответа, Б – график симуляции секреции цитокинов, В–Е – графики популяций В-, Т-клеток. Act – активные, internalized – поглощающие антиген, Pres II – презентующие на MHC II, Dup – в митотическом цикле, Anergic – анергичные, Resting – неактивные, TH – TX, TC – ЦТ, Mem – клетки памяти, TR – регуляторные клетки, IL – интерлейкин, INF – интерферон, TNF – фактор некроза опухоли, TGF-b – TGFβ1, Ig – иммуноглобулин, Ag – антиген, D – общий сигнал опасности.

Fig. 10. Immune simulation of MEV: A – graph of humoral response, B – graph of simulation of cytokine secretion, B–E – graphs of populations of B-, T-cells. Act – active, internalized – absorbing antigen, Pres II – presenting on MHC II, Dup – in the mitotic cycle, Anergic – anergic, Resting – inactive, TH – TX, TC – CT, Mem – memory cells, TR – regulatory cells, IL – interleukin, INF – interferon, TNF – tumor necrosis factor, TGF-b – TGFβ1, Ig – immunoglobulin, Ag – antigen, D – general danger signal.

ным, что указывает на то, что вакцина оказывает аналитическое более широкое воздействие. Также в программе были вычислены 12 В- и 87 Т-эпитопов для наиболее распространенных HLA (A*01:01, 02:01, В*07:02, 13:01, DRB1*01:01, 04:01). Эти прогнозы иммунного моделирования предполагают, что вакцина потенциально может активировать Т- и В-клетки для выработки антител, что приводит к развитию клеток долговременной памяти после повторного воздействия антигена. Прогноз иммунного моделирования показал, что вакцинная конструкция обладает потенциалом вызывать сильные врожденные и адаптивные иммунные реакции в иммунной системе человека против бруцеллеза.

Клонирование МЭВ *in silico*. Оптимизация кодонов для экспрессии в системе *E. coli*

В программе Codon Adaptation Tool проводили оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности МЭВ для экспрессии в системе *E. coli* в плазмиде pET22b(+) по сайтам рестрикции NcoI/XhoI, длина гена составила 1926 п.о., CAI = 1,0, GC-состав – 52%.

Бруцеллез является самым распространенным зоонозом во всем мире. Ежегодно в мире регистрируется около 500 тыс. новых случаев заболевания, что составляет, по разным оценкам, <5% от общей заболеваемости бруцеллезом. В нашей стране на протяжении десятилетий заболеваемость составляет 0,2–0,7 на 100 тыс. населения. Применение вакцины против бруцеллеза является эффективным и экономически выгодным подходом к снижению заболеваемости и смертности от инфекции у животных, а также у людей [2].

Современные достижения науки в области технологий секвенирования нового поколения, наличие массивных геномных и протеомных данных в общедоступных базах данных привели к разработке новых подходов к созданию вакцин. Методы обратной вакцинологии и иммуноинформатики позволяют выявить наиболее перспективных кандидатов в вакцины, оценить структуру и свойства, основываясь на данных их генетической последовательности [3].

В нашей работе с помощью методов ОБ мы создали прототип МЭВ против бруцеллеза. Исследование включало несколько этапов. С помощью методов, описанных ранее [7], а также по данным анализа литературы был отобран 91 эссенциальный (необходимый для жизнедеятельности микроорганизма) и константный для протеомов патогенных видов *Brucella* бруцеллезный белок. Большинство из них имело прогнозируемую поверхностную локализацию в клетке, что предопределяло их высокую доступность для иммунной системы и способность вызвать иммунный ответ. Однако для некоторых белков (шаперон GroEL, рибосомные белки L9, L7/L12), имеющих преимущественно внутриклеточную локализацию, в литературе описаны свидетельства их высокой иммуногенности, в связи с чем они были также включены в работу. Важным аспектом отбора кандидатных белков для последующего анализа являлось исключение гомологов белков человека и его микробиоты, что уменьшало риск развития аутоиммунных реакций у людей на вводимую вакцину.

На следующем этапе исследования вычислялись Т- и В-эпитопы отобранных белков для включения в МЭВ. Для максимального охвата населения, восприимчивого к вакци-

не, отбор Т-эпитопов из бруцеллезных белков проводился с учетом полиморфизма MHC на территории РФ. Скрининг наиболее перспективных для МЭВ ЦТЭ и ТХ проводился по степени их сродства к антигенам HLA I и II соответственно, а также на основе прогноза их гидрофильности, иммуногенности, антигенности, отсутствию гомологии с белками человека, аллергенных и токсичных свойств, а также по другим указанным выше параметрам. Из более чем 10 000 предсказанных Т-эпитопов для включения в МЭВ было отобрано только 22. Несмотря на превалирование клеточного иммунного ответа в защите от внутриклеточных патогенов, при разработке МЭВ сложилась концепция включения в их аминокислотную последовательность антигенных детерминант антительного ответа для более широкого воздействия на иммунитет и перспектив серодиагностики. В нашей работе в состав МЭВ были включены как линейные, так и конформационные ВЭ. При отборе учитывались как антигенные, иммуногенные, так и физико-химические свойства пептида.

Для повышения иммуногенности в состав МЭВ были включены 2 адьювантные молекулы. Пептид PADRE часто используется в качестве адьюванта во многих иммунотерапевтических вакцинах, так как активирует ТХ, имея панспецифическое сродство к 15 из 16 наиболее распространенных антигенов HLA-DR [11]. Для рибосомального белка L7/L12 была продемонстрирована способность специфически стимулировать моноциты инфицированных животных, повышать уровень транскрипции и экспрессии ИФН- γ , кроме того, он также является агонистом TLR-4, инициируя врожденный иммунный ответ [12].

В работе была сконструирована МЭВ, содержащая 642 аминокислотных остатка, включающая 11 ЦТЭ, 11 ТХЭ, 8 ВЭ, разделенных линкерами, 2 адьювантные молекулы на N- и гистидиновый таг на C-конце полипептидной цепи. Предложены условия для эффективной экспрессии белка в системе *E. coli*. Согласно расчетам, рекомбинантный белок, перспективный в качестве МЭВ, определен как высокорастворимый, стабильный в растворе, термостабильный, гидрофильный, неаллергенный, нетоксичный, с высокими показателями антигенности и иммуногенности.

Информация о трехмерной структуре имеет решающее значение для изучения активности вакцины, понимания ее биомолекулярных взаимодействий с рецепторами иммунных клеток человека. В нашей работе была рассчитана 3D-модель МЭВ, проведено уточнение ее структуры, минимизация свободной энергии с целью повышения ее качества и стабильности. Также проводился молекулярный докинг улучшенной модели с иммунными структурами, который показал энергетически выгодное взаимодействие как с различными рецепторами врожденного иммунитета TLR, так и с антигенами HLA (A*02 и DRB1*04). Симуляция молекулярной динамики белкового комплекса МЭВ/TLR-4 в разных компьютерных программах продемонстрировала устойчивость, низкие гибкость и деформируемость структуры. Симуляция иммунного ответа в программе показала наиболее выраженную реакцию иммунитета на повторное введение вакцины. Она стимулировала преимущественно Th1-ответ, высокий уровень секреции ИЛ-2, ИФН- γ , временное повышение секреции антител, а также длительную продукцию В- и Т-клеток памяти.

В данном исследовании представлена конструкция мультиэпитопной химерной вакцины с использованием компонентов бруцеллезных белков. Согласно биоинформатическому анализу, она может быть получена в качестве рекомбинантного белка в системе *E. coli*, должна сохранять стабильность как в растворе, так и в организме, эффективно стимулировать врожденный и приобретенный иммунитет, приводя к формированию и поддержанию активной иммунологической памяти. Тем не менее, несмотря на успехи применения ОВ для создания вакцин, в настоящее время данный метод имеет некоторые ограничения, связанные с отсутствием точной методологии прогнозирования, стандартного набора вычислительных исследований и практических наработок по валидации результатов расчетов *in silico*. На данном этапе развития компьютерных технологий все еще требуются тщательные исследования по подтверждению безопасности и эффективности прогнозируемой вакцины *in vitro* и *in vivo*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках НИОКР 3.1.2 по государственному заданию.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 3.1.2 on a government assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. WHO. Immunization Agenda 2030: A Global Strategy To Leave No One Behind. 2020.
2. Охупкина ВЮ, Пяткова НВ, Павлов ДЛ, Сулопаров АА. Эпидемиологическая опасность бруцеллеза в современных условиях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(3):15-22. / Okhapkina VYu, Pyatkova NV, Pavlov DL, Susloparov AA. Epidemic Risk of Brucellosis in Modern conditions. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2016;15(3):15-22. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-15-22 (In Russian).
3. Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, Finco O, De Gregorio E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. J Exp Med. 2016 Apr 4;213(4):469-81. DOI: 10.1084/jem.20151960
4. Masignani V, Pizza M, Moxon ER. The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. Front Immunol. 2019 Apr 16;10:751. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00751
5. Enayatkhani M, Hasaniazad M, Faezi S, Gouklani H, Davoodian P, Ahmadi N, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study. J Biomol Struct Dyn. 2021 May;39(8):2857-2872. DOI: 10.1080/07391102.2020.1756411
6. Chen Z, Zhu Y, Sha T, Li Z, Li Y, Zhang F, et al. Design of a new multi-epitope vaccine against *Brucella* based on T and B cell epitopes using bioinformatics methods. Epidemiol Infect. 2021 May 25;149:e136. DOI: 10.1017/S0950268821001229
7. Saadi M, Karkhah A, Nouri HR. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. Infect Genet Evol. 2017 Jul;51:227-234. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.04.009
8. Дятлова ВИ. Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2021; 6(4): 16–29. / Dyatlova VI. Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis. Bacteriology. 2021;6(4):16-29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29 (In Russian).
9. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622748 Российская Федерация. Эпитопы антигенов бруцелл, активирующие Т-хелперы, перспективные для использования в составе мультиэпитопных вакцин против бруцеллеза: №2022622699: заявл. 31.10.2022: опубл. 03.11.2022. Дятлова ВИ; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». EDN DZYWRE. / Certificate of state registration of the database No 2022622748 Russian Federation. Epitopes of Brucella antigens that activate T-helper cells, promising for use in multi-epitope vaccines against brucellosis: No 2022622699: application. 10/31/2022: publ. 03.11.2022. Dyatlova VI; applicant Federal Budgetary Institution of Science «State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology». EDN DZYWRE. (In Russian).
10. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622856 Российская Федерация. Эпитопы антигенов бруцелл, активирующие цитотоксические Т-лимфоциты, перспективные для использования в составе мультиэпитопных вакцин против бруцеллеза: №2022622696: заявл. 28.10.2022: опубл. 14.11.2022. Дятлова ВИ; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. EDN ZVTQHA. / Certificate of state registration of the database No 2022622856 Russian Federation. Epitopes of Brucella antigens that activate cytotoxic T-lymphocytes, promising for use in multi-epitope vaccines against brucellosis: No 2022622696: application. 10/28/2022: publ. 11/14/2022. Dyatlova VI; applicant Federal Budgetary Institution of Science «State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. EDN ZVTQHA. (In Russian).
11. Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. Immunol Lett. 2004 Apr 15;92(3):259-68. DOI: 10.1016/j.imlet.2004.01.006
12. Golshani M, Rafati S, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Shahcheraghi F, Arsang A, et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding Brucella L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. Mol Immunol. 2015 Aug;66(2):384-91. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.04.015

Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация

В.В.Кузин, Н.В.Колупаева, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, И.А.Дятлов

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

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – оппортунистический патоген, вызывающий широкий спектр внутри- и внебольничных инфекций. Рост числа заболеваний обусловлен распространением антибиотикорезистентных штаммов возбудителя. Одной из причин устойчивости данного патогена к антибактериальным препаратам является его способность образовывать биопленки. Развитию и распространению синегнойной инфекции способствует неграмотный подбор антибактериальных препаратов при лечении и некачественная дезинфекция при проведении профилактических мероприятий. В работе приведен перечень дезинфицирующих веществ и определены эффективные режимы их применения для разрушения биопленок *P. aeruginosa*. Описано комплексное применение дезинфектантов совместно с факторами разрушения матрикса. Изучен транскрипционный ответ клеток *P. aeruginosa* в биопленке на воздействие дезинфицирующих веществ.

Ключевые слова: биопленка *Pseudomonas aeruginosa*, дезинфицирующие вещества, стресс, гены, экспрессия, ферменты

Для цитирования: Кузин В.В., Колупаева Н.В., Щербакова О.А., Колупаева Л.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Дятлов И.А. Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация. Бактериология. 2023; 8(4): 28–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-28-35

Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation

V.V.Kuzin, N.V.Kolupaeva, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, I.A.Dyatlov

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

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen causing a wide range of hospital-acquired and nosocomial infections. The increase in the number of diseases is due to the spread of antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa*. One of the reasons for the resistance of this pathogen to antibacterial drugs is its ability to form biofilms. Illiterate selection of antibacterial drugs during treatment and poor quality disinfection during prophylactic measures contribute to the development and spread of *P. aeruginosa* infection. The paper provides a list of disinfectants and determines effective modes of their use to destroy *P. aeruginosa* biofilms. The complex application of disinfectants together with matrix disruption factors is described. The transcriptional response of *P. aeruginosa* cells in the biofilm to the effect of disinfectants was studied.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, disinfectants, stress, genes, expression, enzymes

For citation: Kuzin V.V., Kolupaeva N.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva L.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Dyatlov I.A. Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation. Bacteriology. 2023; 8(4): 28–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-28-35

P*seudomonas aeruginosa* – условно-патогенный микроорганизм, входящий в группу наиболее опасных патогенов ESKAPE. Бактерия является причиной возникновения широкого спектра острых инфекций, таких как внутрибольничная пневмония, ожоговые и раневые инфекции, а также может быть причиной хронической инфекции у пациентов с

муковисцидозом [1–7]. Быстрое распространение и высокая смертность от заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*, обусловлена большим набором факторов вирулентности, высокой природной резистентностью, а также способностью этих бактерий образовывать биопленки. Синегнойная палочка является четвертым по частоте встречаемости патогеном,

Для корреспонденции:

Кузин Виктор Владимирович, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182

Статья поступила 25.10.2023, принята к печати 26.12.2023

For correspondence:

Viktor V. Kuzin, Researcher of the Department for training and improvement of specialists of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24 «Quarter A» Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182

The article was received 25.10.2023, accepted for publication 26.12.2023

вызывающим около 8% хронических раневых инфекций, и седьмым по значимости, вызывающим до 6% инфекций кровотока [8].

В 2017 г. *P. aeruginosa* была признана Всемирной организацией здравоохранения одной из наиболее опасных для жизни инфекций и включена в список приоритетных патогенов для исследований и разработки новых антибиотиков [9]. Высокая резистентность к большинству противомикробных препаратов (антибиотики, биоциды и дезинфектанты) обусловлена ограниченной проницаемостью внешней мембраны, наличием эффлюксных насосов, которые выкачивают биоциды из клетки, выработкой ферментов, инактивирующих антибиотики, способностью образовывать биопленки [10–12].

Не менее важной проблемой является распространение данного патогена во внебольничной среде: пищевой и косметической промышленности, социальной и бытовой сфере.

В настоящее время основными направлениями в борьбе с биопленками являются: поиск антиадгезивных материалов, применение дезинфицирующих средств, разрушающих матрикс биопленки, комбинированное воздействие антибактериальных веществ и факторов, разрушающих матрикс, разработка соединений, подавляющих чувство кворума, поиск и конструирование генно-инженерных фагов. Из перечисленных вариантов применение дезинфицирующих средств остается наиболее дешевым, эффективным и простым методом.

Некачественная дезинфекция может стать причиной распространения биологических пленок на медицинских изделиях (катетерах, искусственных суставах, механических клапанах сердца и пр.) и других поверхностях в лечебно-профилактических учреждениях, что может приводить к распространению острых и хронических инфекций у пациентов.

Известно, что процессы формирования биологических пленок контролируются большим количеством генов [13]. Однако транскрипционный ответ генов, участвующих в формировании биопленки *P. aeruginosa*, при действии химических и биологических веществ подробно не изучен. Понимание того, как различные антимикробные агенты влияют на экспрессию генов, играющих роль в образовании биологических пленок, может привести к разработке новых препаратов и стратегий их применения.

Целью данного исследования являлось определение минимальных концентраций дезинфицирующих веществ, эффективных для разрушения биопленок *P. aeruginosa*, и исследование изменения уровней экспрессии генов биопленкообразования в условиях стресса.

Материалы и методы

Антибактериальные препараты

Использовали 11 химических дезинфицирующих веществ (ДВ) различных функциональных классов, таких как катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ): бензалкония хлорид (четвертичное аммониевое соединение (ЧАС)), N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин (третичный амин), полигексаметиленгуанидин (ПГМГ); кислородоактивные соединения: перекись водорода, диоксид хлора; хлорактивные соединения (дихлоризоциануровая кислота (ДХЦК), гипохлорит натрия, нейтральный анолит, хлоргексидина гидрохлорид); альдегиды (глутаровый и ортофталевый). Для разрушения

матрикса использовали ферменты класса гидролаз (протеаза, липаза, моноаза) и ион-коагулянты (трилоны А и Б).

Штаммы микроорганизмов

В работе использовали клинические изоляты *P. aeruginosa*, выделенные в 2017–2020 гг. от пациентов НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н.Бурденко ($n = 37$). В качестве референс-штамма использовали лабораторный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» и рекомендованный руководством Р 4.2.3676-2020 для тестирования дезинфицирующих средств [14].

Определение способности штаммов *P. aeruginosa* к образованию биопленок

Эффективность образования бактериальных биопленок исследуемых штаммов *P. aeruginosa* определяли методом окраски красителем кристаллическим фиолетовым биопленки, сформированной на стенках 96-луночного планшета [15]. Для получения биологических пленок культуры выращивали до стационарной фазы, вносили в лунки планшета и инкубировали при температуре 37°C в течение 3–5 суток. Для получения достоверных результатов использовали не менее 4–5 лунок на один опытный образец. Образовавшиеся биопленки окрашивали и проводили количественный учет связанного красителя спектрофотометрически.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Суспензию клеток *P. aeruginosa* засеивали в чашки Петри с плотной питательной средой, выращивали в течение 6, 12, 24 и 48 ч, моделируя различные фазы формирования биопленки. На поверхность сформированных биопленок с помощью пинцета помещали стерильный аппликатор из пластика размером 10 × 10 мм на 3 мин. Для окрашивания матрикса аппликаторы помещали в 8-луночный планшет, вносили краситель TOTO-1 (Thermo, США) и оставляли на 15 мин в темноте. Далее отбирали раствор первого красителя и добавляли краситель SYTO 60 red (Thermo, США) для окрашивания живых клеток. Через 15 мин образцы отмывали и фиксировали 0,25%-м раствором глутарового альдегида [16]. Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива 60× (объектив UPLXAP060XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры с длиной волны излучения 488 и 561 нм для окрашенных SYTO 9 и SYTO 60 red образцов соответственно. Мощность лазеров составляла 10% от максимальной. Анализ образцов слепым методом и получение трехмерных изображений проводили с интервалом по оси Z 0,36 мкм. Результаты анализировали в программе LSM Image Browser (NIH, США) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Дания).

Определение эффективности применения дезинфицирующих веществ для разрушения планктонных клеток и биопленок *P. aeruginosa*

Режимы применения ДВ для разрушения планктонных клеток и биопленок *P. aeruginosa* определяли методом аппликаторов [17]. Аппликаторы с отпечатком культуры, выращенной

Таблица 1. Режим амплификации РВ-ПЦР с флуоресцентной детекцией в присутствии SYBR Green I
Table 1. RT-PCR amplification mode with fluorescent detection in the presence of SYBR Green I

Этап реакции / Reaction stage	Описание / Description	Температурно-временной режим / Temperature-time regime	Количество циклов / The number of cycles
1	Начальная денатурация / Initial denaturation	+95°C – 5 мин	1
2	Денатурация / Denaturation	+95°C – 20 с	39
	Отжиг / Annealing	+61°C – 20 с*	
	Элонгация / Elongation	+72°C – 30 с	
3	Считывание флуоресцентного сигнала / Reading the fluorescent signal	+65...+95°C – 5 с (каждую секунду повышается на 0,5°C) / +65...+95°C – 5 sec (every second increases by 0.5°C)	1
4	Хранение / Storage	+10°C	1

Таблица 2. Праймеры, используемые в исследовании
Table 2. Primers used in the study

Ген / Gene	F/R	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3') / Oligonucleotide sequence (5'→3')	Размер ПЦР- продукта, п.н. / Size of PCR product, bp	Источник / Reference
16s	F	CTGCCTGGTAGTGGGGGATA	149	[19]
	R	GTCGCCTTGGTAGGCCCTTTA		
algR	F	CCGACCACAAGTACGTGACC	195	[20]
	R	CGTCGAGGCCTTTCAGGTAG		
gyrB	F	ATCTCGGTGAAGGTACCGGA	139	[21]
	R	TGGCTTCGTTGGGATTCTCC		
oprL	F	CCCGCGAGTACAATATGGCT	122	[22]
	R	GACCGGACGCTCTTTACCAT		
siaB	F	ATCCTGCTCTGCTCAACGG	170	[23]
	R	CCCTTGAGGTTGGCGTAGTG1		

в течение 6 ч (планктонная форма) или 48 ч (био пленка), помещали в раствор ДВ на 30 мин. Для оценки комплексного воздействия дезинфицирующих веществ и соединений, разрушающих матрикс, био пленки предварительно обрабатывали раствором ферментов и ион-коагулянтов в течение 5 мин. После обработки аппликаторы переносили в пробирки с жидкой питательной средой и культивировали при температуре 37°C в течение 3–5 суток. Эффективность обработки оценивали по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Измерение уровней экспрессии генов *P. aeruginosa* при воздействии дезинфицирующих веществ

После выдержки аппликатора с отпечатком био пленки в растворе ДВ проводили трехкратную отмывку проб в стерильном буфере PBS и выделение нуклеиновых кислот методом фенол-хлороформной экстракции с помощью набора РНК-экстран («Синтол», Москва, Россия). Для очистки проб от остатков геномной ДНК полученную смесь обрабатывали TurboDNase. Отсутствие ДНК контролировали при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) и электрофореза. Синтез кДНК осуществляли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Уровень представленности транскриптов изучаемых генов оценивали при помощи РВ-ПЦР в присутствии интеркалятора SYBR. Амплификацию проводили по режиму, указанному в табл. 1, с использованием специфических праймеров (табл. 2). Статистическую обработку данных проводили по методу Pfaffl [18].

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка интенсивности био пленкообразования штаммов *P. aeruginosa*

Анализ величин относительных показателей плотности био пленок, сформированных *P. aeruginosa* ($n = 37$), выявил, что все исследуемые штаммы обладали способностью образовывать био пленки. По этому показателю они были разделены на три категории: с высокой интенсивностью образования био пленки – 84% ($n = 31$), средней – 11% ($n = 4$) и низкой – 5% ($n = 2$). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными [24]. Для исследований были выбраны лабораторный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 и три клинических штамма *P. aeruginosa* (B2616p/20, F19-4Pa/19, B70p/19) с самой высокой интенсивностью био пленкообразования.

Чувствительность бактериальных пленок к дезинфицирующим веществам

Чувствительность био пленок вышеуказанных штаммов к воздействию ДВ определяли по методу O'Toole [15], предварительно обрабатывая лунки планшета со сформированной био пленкой растворами ДВ.

Таблица 3. Чувствительность био пленок *P. aeruginosa* к биоцидам
Table 3. Sensitivity of *P. aeruginosa* biofilms to biocides

Штаммы / Strains	ДВ / DS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>P. aeruginosa</i> B2616p/20	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> B70p/19	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> F19-4p.a./19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1 – ЧАС 0,5%; 2 – ПГМГ 0,4%; 3 – триамин 0,1%; 4 – перекись водорода 3%; 5 – диоксид хлора 0,05%; 6 – хлоргексидин 0,5%; 7 – гипохлорит натрия 0,1%; 8 – ДХЦК 0,015% по активному хлору (АХ); 9 – нейтральный анолит 0,03% (по АХ); 10 – глутаровый альдегид 1,0%; 11 – ортофталевый альдегид 0,3%; «-» – штамм чувствителен к дезинфектанту; «+» – штамм не чувствителен к дезинфектанту.
1 – QAC 0.5%; 2 – PHMG 0.4%; 3 – triamine 0.1%; 4 – hydrogen peroxide 3%; 5 – chlorine dioxide 0.05%; 6 – chlorhexidine 0.5%; 7 – sodium hypochlorite 0.1%; 8 – ДХЦК 0.015% for active chlorine (AC); 9 – neutral anolyte 0.03% (according to AC); 10 – glutaraldehyde 1.0%; 11 – orthophthalic aldehyde 0.3%; “-” – the strain is sensitive to the disinfectant; “+” – the strain is not sensitive to the disinfectant.

Таблица 4. Режимы применения дезинфектантов для разрушения биопленок *P. aeruginosa*
 Table 4. Regimes for using disinfectants to destroy *P. aeruginosa* biofilms

Действующее вещество / Active ingredient	Концентрация раствора по действующему веществу, % / Concentration of solution according to active ingredient, %			
	Планктонная культура / Planktonic culture	Биопленка / Biofilm	Биопленка (с разрушенным матриксом) / Biofilm (with destroyed matrix)	
ЧАС / QAC	0,05	1,0	0,2 (П Л М)	0,1 (ТБ)
ПГМГ / PHMG	0,03	0,8	0,5 (М)	0,1 (ТБ)
Третичный амин / Tertiary amine	0,01	0,5	0,07 (Л М)	0,03 (ТБ)
Перекись водорода / Hydrogen peroxide	2,0	5,0	2,0 (М)	3,0 (ТБ)
Диоксид хлора / Chlorine dioxide	0,02	0,1	0,02 (М)	0,05 (ТБ)
Хлоргексидин / Chlorhexidine	0,05	1,0	0,1 (М)	0,1 (ТБ)
Гипохлорит натрия / Sodium hypochlorite	0,075	0,2	0,1 (М)	0,1 (ТБ)
ДХЦК (по АХ) / SDIC (by АС)	0,0075	0,03	0,015 (П Л М)	0,0075 (ТА)
Нейтральный анолит (по АХ) / Neutral anolyte (by АС)	0,02	0,05	0,04 (П Л М)	0,04 (ТА ТБ)
Глутаровый альдегид / Glutaraldehyde	0,25	2,5	1,0 (П Л М)	0,5 (ТБ)
Ортофталевый альдегид / Orthophthalic aldehyde	0,1	0,6	0,1 (М)	0,1 (ТБ)

ДХЦК – дихлоризоцианурат натрия; П – протеаза, 1%; Л – липаза, 1%; М – маннанназа, 1%; ТА – Трилон А, 1%; ТБ – Трилон Б, 1%. / P – protease, 1%; L – lipase, 1%; M – mannanase, 1%; TA – Trilon A, 1%; TB – Trilon B, 1%.

Основываясь на показателях оптической плотности (OD590), можно сделать вывод о том, что штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* F19-4p.a./19 были наиболее устойчивыми к большинству исследуемых ДВ (табл. 3), при этом последний обладал резистентностью ко всему перечню тестируемых биоцидов.

Для определения эффективных режимов применения ДВ использовали метод аппликаторов, который позволяет проводить прямую оценку выживаемости бактерий в составе биопленок. Исследования проводили на двух наиболее устойчивых штаммах, указанных выше.

Показано, что бактерии *P. aeruginosa* в планктонном состоянии более чувствительны ко всем тестируемым ДВ, чем в форме биопленки. Для всех исследованных веществ отмечено увеличение минимальной бактерицидной концентрации (МБК), необходимой для разрушения биопленки относительно планктонной культуры. Например, при применении перекиси водорода была выявлена разница в концентрациях в 2,5 раза, для хлорактивных соединений – в 3–5 раз, альдегидов – в 6–10 раз (табл. 4). Существенные различия в МБК наблюдались при использовании ЧАС и ПГМГ – в 20 и 27 раз соответственно. Наибольшая разница была отмечена для третичного амина – до 50 раз. Результаты исследования согласуются с данными, опубликованными ранее [25]. Такое значительное увеличение разницы значений МБК связано с наличием экзополисахаридного матрикса, препятствующего проникновению биоцидов внутрь биопленки [26]. Эффективным методом снижения рабочих концентраций является разрушение матрикса при помощи активных по отношению к нему веществ, таких как ферменты класса гидролаз и ион-коагулянты.

Предварительная обработка биопленок исследуемых штаммов *P. aeruginosa* 1%-ми растворами гидролитических ферментов (протеаза, липаза, маннанназа) и ион-коагулянтов (Трилон А, Трилон Б) позволила значительно снизить МБК тестируемых дезинфицирующих веществ. Было отмечено, что разница значений МБК для планктонных клеток и

биопленок снижается до 2–3 раз для катионных ПАВ и до двух и менее раз для хлорактивных, кислородоактивных соединений и альдегидов. В некоторых случаях значения МБК для планктонной и биопленочной формы совпадали.

Установлено, что самым активным ферментом была маннанназа, что обусловлено ее воздействием, направленным на разрушение β -1,4-гликозидной связи в полисахаридах [27]. Применение маннанназы совместно с кислородоактивными соединениями позволило снизить значения МБК биопленок до значений МБК планктонных клеток.

Среди ион-коагулянтов Трилон Б проявлял наибольшую активность при разрушении экзополисахаридного матрикса, что также показано в исследовании Bakht M. [28]. Максимальная эффективность данного вещества наблюдалась при его совместном применении с катионными ПАВ. Следует отметить, что снижение МБК ДХЦК в отношении биопленок до значений планктонной формы наблюдалось только при использовании Трилон А.

Проведенные эксперименты показали, что бактерицидные концентрации ДВ не способны разрушить матрикс биопленок, но остался открытым вопрос, какое влияние эти вещества оказывают на формирующуюся и сформированную биопленку.

Экспрессия генов биопленкообразования *P. aeruginosa* при воздействии дезинфицирующих веществ

Изменение уровней экспрессии генов, участвующих в образовании биопленок, изучали на разных стадиях их формирования, таких как: начальное прикрепление (6 ч), образование микроколоний (12 ч), формирование (24 ч) и созревание биопленки (48 ч). Визуализацию процесса формирования биологической пленки *P. aeruginosa* проводили при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Исследования выявили характерную для биопленок трехмерную структуру организации. Толщина сформированной биопленки колебалась в пределах 10–40 мкм (рис.1).

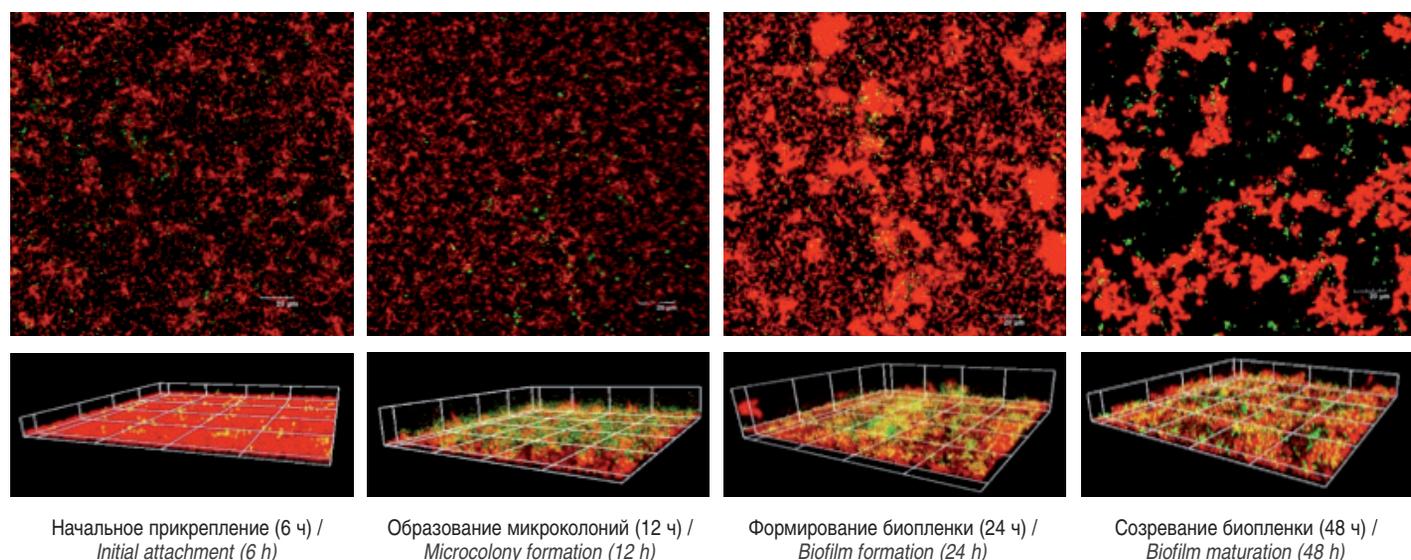


Рис. 1. Визуализация биологических пленок *P. aeruginosa* на различных стадиях формирования.
Fig. 1. Visualization of biological films of *P. aeruginosa* at various stages of formation.

Для исследования транскрипционного ответа клеток в составе биопленки на стресс применяли метод аппликаторов. В работе оценивалось изменение уровней экспрессии генов, ответственных за адгезию (*siaB*) [20], формирование матрикса (*algR*) [21] и устойчивость биопленок к антимикробным препаратам (*gyrB* и *oprL*) [22–23]. В качестве стрессового фактора использовали перекись водорода, ЧАС, гипохлорит натрия и ДХЦК в бактерицидных концентрациях.

При воздействии перекиси водорода в концентрации 2% на стадиях начального прикрепления и образования микроколоний не было зафиксировано значимых отличий в экспрессии генов, что, предположительно, связано с губительным действием биоцида на клетки, не защищенные матриксом (рис. 2А). На стадии формирования отмечалось небольшое (до 3 раз) увеличение уровня представленности гена *algR*, ответственного за формирование матрикса. На стадии созревания было зафиксировано резкое увеличение экспрессии всех изучаемых генов в ответ на стресс в 10–20 раз, что говорит о возможном увеличении количества экзополисахаридного матрикса и повышении устойчивости к антибактериальным веществам. Полученные результаты указывают на то, что *algR*, возможно, является регулятором формирования биопленки при воздействии окислительного стресса, что согласуется с исследованиями Rubio-Canalejas A. et al. [29].

Воздействие 0,05%-го раствора бензалкония хлорида на клетки в стадии формирования биопленки приводило к увеличению уровня экспрессии гена устойчивости к антимикробным препаратам (*oprL*), при этом на стадии зрелой биопленки экспрессия данного гена резко сокращалась, а экспрессия гена *algR*, ответственного за формирование матрикса, увеличивалась в 10 раз (рис. 2Б). Данный факт может свидетельствовать о различиях в механизмах резистентности формирующихся и сформированных биопленок. В исследовании Nematı S. et al. показано, что бензалкония хлорид в концентрации 0,07% индуцировал образование биопленки у клинических штаммов *P. aeruginosa* [30].

При использовании гипохлорита натрия в качестве стрессового фактора не было выявлено значимого изменения

уровня экспрессии изучаемых генов на стадиях развития и формирования биопленки (6–24 ч) (рис. 2В), что свидетельствует о достаточной эффективности применения бактерицидных концентраций данного вещества для предотвращения образования биопленок *P. aeruginosa*. Однако при воздействии на зрелую биопленку отмечалось резкое увеличение (до 20 раз) экспрессии гена *algR*. Схожую картину наблюдали при использовании ДХЦК. Ее применение в бактерицидной концентрации (0,0075% по активному хлору) приводит к увеличению уровня экспрессии гена, ответственного за выработку матрикса в биопленках (рис. 2Г), тем самым повышая устойчивость к обеззараживанию. Это обусловлено тем, что данный ген может играть роль в регулировании защиты от данных окислителей [31].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что основным геном, ответственным за устойчивость сформированных биопленок к воздействию дезинфицирующих веществ, является *algR*.

Заключение

По результатам проведенных экспериментов подобраны минимальные действующие концентрации ДВ различных классов, обеспечивающие эффективное разрушение биопленок *P. aeruginosa*. Установлено, что наиболее эффективными являются хлорактивные и кислородоактивные ДВ. Выявлено, что применение ферментов класса гидролаз и ион-коагулянтов совместно с дезинфектантами обеспечивает снижение МБК от 2 до 10 раз. Отмечено, что воздействие ДВ на биопленки, находящиеся на ранних стадиях формирования, не приводит к увеличению их устойчивости. Показано, что обработка сформированной биопленки веществами в бактерицидных концентрациях приводит к увеличению уровней экспрессии генов, ответственных за адгезию, формирование матрикса и устойчивость к антимикробным препаратам, что свидетельствует о увеличении устойчивости биологических пленок *P. aeruginosa* к дезинфектантам.

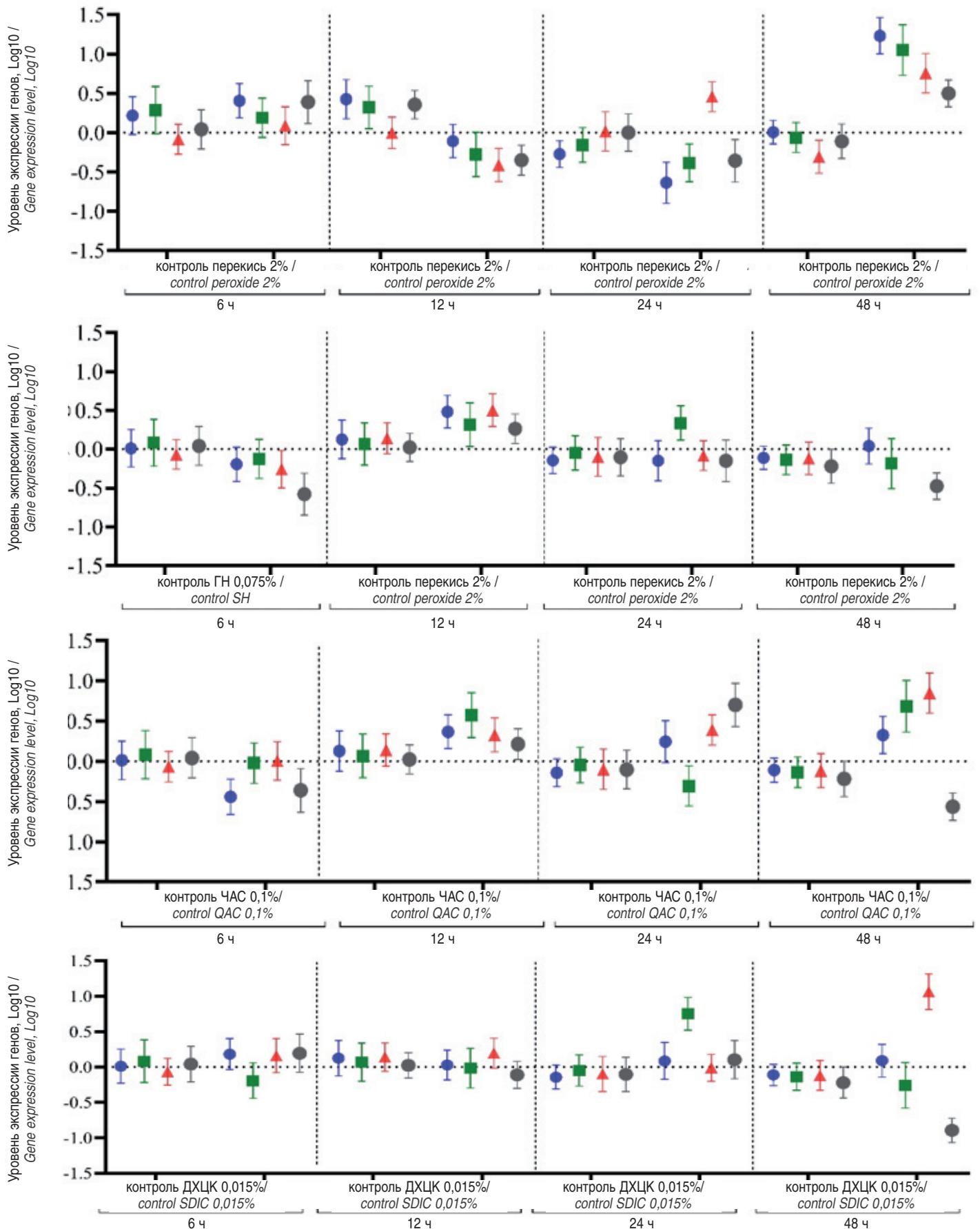


Рис. 2. Изменение уровней экспрессии генов биопленкообразования при воздействии: перекиси водорода (А), ЧАС (Б), гипохлорита натрия (В), ДХЦК (Г).

Fig. 2. Changes in the expression levels of biofilm formation genes when exposed to: hydrogen peroxide (A), QAC (B), sodium hypochlorite (B), SDIC (Г).

● *siaB* ■ *gyrB*
 ▲ *algR* ● *oprL*

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the industry 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

- Fabre V, Amoah J, Cosgrove SE, Tamma PD. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: How long is long enough? Clin Infect Dis. 2019;69:2011-2014. DOI: 10.1093/cid/ciz223
- Lin T-I, Huang Y-F, Liu P-Y, Chou C-A, Chen Y-S, Chen Y-Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infective endocarditis in patients who do not use intravenous drugs: Analysis of risk factors and treatment outcomes. J Microbiol Immunol Infect. 2016;49:516-522. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.08.019
- Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clin Infect Dis. 2010;51:S81-S87. DOI: 10.1086/653053
- Ding C, Yang Z, Wang J, Liu X, Cao Y, Pan Y, et al. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: A systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis. 2016;49:119-128. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.06.014
- Soleimani M, Tabatabaei SA, Masoumi A, Mirshahi R, Ghahvechian H, Tayebi F, et al. Infectious keratitis: Trends in microbiological and antibiotic sensitivity patterns. Eye. 2021;35:3110-3115. DOI: 10.1038/s41433-020-01378-w
- Enzor R, Bowers EM, Perzia B, Perera C, Palazzolo L, Mammen A, et al. Comparison of Clinical Features and Treatment Outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in Contact Lens and Non-Contact Lens Wearers. Am J Ophthalmol. 2021;227:1-11. DOI: 10.1016/j.ajo.2021.02.024
- Phan S, Feng CH, Huang R, Lee ZX, Moua Y, Phung OJ, et al. Relative Abundance and Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from Chronic Wound Infections Globally. Microorganisms. 2023 May 5;11(5):1210. DOI: 10.3390/microorganisms11051210
- Vetrivel A, Ramasamy M, Vetrivel P, Natchimuthu S, Arunachalam S, Kim G-S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. Biologics 2021;1:312-36. DOI: 10.3390/biologics1030019
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Int J Mol Sci. 2020 Nov 17;21(22):8671. DOI: 10.3390/ijms21228671
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Yin R, Cheng J, Wang J, Li P, Lin J. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. Front Microbiol. 2022 Aug 26;13:955286. DOI: 10.3389/fmicb.2022.955286
- Masák J, Čejková A, Schreiberová O, Režanka T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. FEMS Microbiol Ecol. 2014 Jul;89(1):1-14. DOI: 10.1111/1574-6941.12344
- Tan X, Cheng X, Hu M, Zhang Y, Jia A, Zhou J, et al. Transcriptional analysis and target genes discovery of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm developed *ex vivo* chronic wound model. AMB Express. 2021 Nov 27;11(1):157. DOI: 10.1186/s13568-021-01317-2
- Руководство Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. 2020. / Rukovodstvo R 4.2.3676-20. Metody laboratornykh issledovaniy i ispytaniy dezinfektsionnykh sredstv dlya otsenki ikh effektivnosti i bezopasnosti. 2020. (In Russian).
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998 May;28(3):449-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- Diivenji EV, Nevolina ED, Mart'yanov SV, Zhurina MA, Kalmantaeva OV, Makarova MA, et al. Binary Biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide. Microbiology. 2022 Sept; 91(5):563-576. DOI: 10.1134/S002626172260118X
- Детушева ЕВ, Родин ВБ, Слукин ПВ, Ершова ОН, Александрова ИА, Курдюмова НВ, и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015;17(1):57-66. / Detusheva EV, Rodin VB, Slukin PV, Ershova ON, Aleksandrova IA, Kurdyumova NV, et al. Susceptibility of nosocomial *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *P. mirabilis* strains to a chlorhexidine-based antiseptic preparation. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2015;17(1):57-66. (In Russian).
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Amutha K, Kokila V. PCR Amplification, Sequencing of 16S rRNA Genes with Universal Primers and Phylogenetic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. 2014 Aug;3(8):257-261.
- Chen G, Gan J, Yang C, Zuo Y, Peng J, Li M, et al. The SiaA/B/C/D signaling network regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. EMBO J. 2020 Mar 16;39(6):e103412. DOI: 10.15252/embj.2019103412
- De Smet J, Wagemans J, Boon M, Ceysens PJ, Voet M, Noben JP, et al. The bacteriophage LUZ24 "Igy" peptide inhibits the *Pseudomonas* DNA gyrase. Cell Rep. 2021 Aug 24;36(8):109567. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109567
- Kong W, Zhao J, Kang H, Zhu M, Zhou T, Deng X, et al. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res. 2015 Sep 30;43(17):8268-82. DOI: 10.1093/nar/gkv747
- Algammal AM, Eidaroos NH, Alfifi KJ, Alatawy M, Al-Harbi AI, Alanazi YF, et al. oprL Gene Sequencing, Resistance Patterns, Virulence Genes, Quorum Sensing and Antibiotic Resistance Genes of XDR *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Broiler Chickens. Infect Drug Resist. 2023 Feb 13;16:853-867. DOI: 10.2147/IDR.S401473
- Детушева ЕВ, Ершова ОН, Фурсова НК. Чувствительность планктонных культур и биопленок грамотрицательных бактерий к коммерческим препаратам дезинфектантов и антисептиков. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(7):438-447. / Detusheva EV, Ershova ON, Fursova NK. The sensitivity of planktonic cultures and biofilms of gram-negative bacteria to commercial disinfectant and antiseptic preparations. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(7):438-447. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447 (In Russian).
- Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J Med Microbiol. 2008 Aug;57(Pt 8):966-973. DOI: 10.1099/jmm.0.47668-0.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010 Sep;8(9):623-33. DOI: 10.1038/nrmicro2415
- Abaturov A. Polysaccharide-degrading enzymes as agents dispersing bacterial biofilms. Child's Health. 2021;15(4):271-278.
- Bakht M, Alizadeh SA, Rahimi S, Kazemzadeh Anari R, Rostamani M, Javadi A, et al. Phenotype and genetic determination of resistance to common disinfectants among biofilm-producing and non-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains

- from clinical specimens in Iran. BMC Microbiol. 2022 May 7;22(1):124. DOI: 10.1186/s12866-022-02524-y
29. Rubio-Canalejas A, Admella J, Pedraz L, Torrents E. *Pseudomonas aeruginosa* Nonphosphorylated AlgR Induces Ribonucleotide Reductase Expression under Oxidative Stress Infectious Conditions. mSystems. 2023 Apr 27;8(2):e0100522. DOI: 10.1128/msystems.01005-22
30. Hemati S, Kouhsari E, Sadeghifard N, Maleki A, Omidi N, Mahdavi Z, et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of biocides induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. New Microbes New Infect. 2020 Oct 19;38:100794. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100794
31. Lizewski SE, Lundberg DS, Schurr MJ. The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infect Immun. 2002 Nov;70(11):6083-93. DOI: 10.1128/IAI.70.11.6083-6093.2002

Информация о соавторах:

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

ЩербакOVA Ольга Анатольевна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Грищенко Наталья Семёновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga A. Shcherbakova, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Lyubov V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

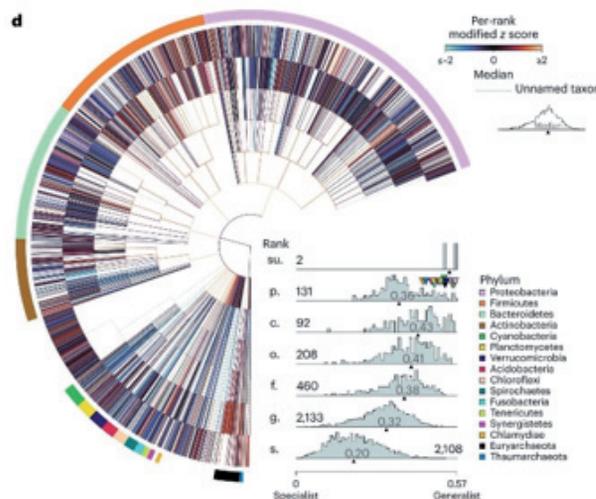
Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DScs, Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Оценка широты социальной ниши показывает стратегии диапазона ниш универсалов и специалистов

Универсалы могут выжить во многих средах, тогда как специалисты ограничены одной средой. Несмотря на то, что это классическая концепция в экологии, широта ниши остается сложной для количественной оценки микроорганизмов, поскольку она зависит от объективного определения окружающей среды. Определяя среду микроорганизма как сообщество, в котором он обитает, исследователи объединили информацию из более чем 22 000 образцов секвенирования окружающей среды, чтобы получить количественную меру ниши, которую мы называем шириной социальной ниши. На уровне родов они исследовали стратегии распределения ниш по всему прокариотическому дереву жизни. Было обнаружено, что к социальным универсалам относятся оппортунисты, которые стохастически доминируют в местных сообществах, тогда как социальные специалисты стабильны, но малочисленны. У социальных универсалов более разнообразный и открытый пангеном, чем у социальных специалистов, но глобальной корреляции между шириной социальной ниши и размером генома не обнаружено. Вместо этого наблюдались две различные эволюционные стратегии, согласно которым специалисты имеют относительно небольшие геномы в местах обитания с низким местным разнообразием, но относительно большие геномы в местах обитания с высоким местным разнообразием. Этот анализ проливает свет на стратегии микробной ниши, основанный на данных.



Von Meijenfeldt FAB, Hogeweg P, Dutilh BE.

A social niche breadth score reveals niche range strategies of generalists and specialists. Nat Ecol Evol. 2023.

DOI: 10.1038/s41559-023-02027-7

Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

М.А.Сотникова, К.В.Хлопова, Г.М.Вахрамеева, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов

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

Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* – внутриклеточный паразит, одним из факторов патогенности которого является система транспорта VI типа, содержащая в составе пилей белок IglC. Для инактивации активных форм кислорода, вырабатываемых инфицированными *F. tularensis* клетками макроорганизма, бактерия синтезирует ферменты супероксиддисмутазы SodB и SodC. В работе количественным методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) проведена оценка транскрипционной активности генов *sodB*, *sodC* и *iglC* в зависимости от фазы роста вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и состава питательных сред. Показано, что уровень мРНК гена *iglC* в бактериях, культивированных в среде ВНИ, существенно превышал уровень мРНК гена *iglC* по сравнению со средой ЖПС. Уровень мРНК гена *sodB* в среде ЖПС не менялся вне зависимости от фазы роста, тогда как уровень мРНК гена *sodB* в среде ВНИ снизился в 5 раз при достижении стационарной фазы. Количество мРНК гена *sodC* на ранней и поздней фазах роста в ВНИ было практически идентичным, тогда как в среде ЖПС количество мРНК гена *sodC* на поздней фазе роста было 2,8 раза больше по сравнению с ранней фазой. Показано, что скорость роста бактерий в питательной среде ЖПС была достоверно выше по сравнению со средой ВНИ. Культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенная в среде ВНИ, обладала повышенной способностью к диссеминации в организме инфицированных мышей линии BALB/c на ранних стадиях инфекционного процесса. Предложено использовать, наряду с традиционными методами оценки эффективности питательных сред для культивирования вакцинных туляремийных штаммов, современный постгеномный подход, заключающийся в определении методом ПЦР-РВ транскрипционной активности генов белков IglC, SodB и SodC, играющих важную роль в инициации вакцинального процесса.

Ключевые слова: *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, мРНК, *sodB*, *sodC*, *iglC*, питательная среда, мыши BALB/c

Для цитирования: Сотникова М.А., Хлопова К.В., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М. Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Бактериология. 2023; 8(4): 36–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-36-41

Influence of the composition of the nutrient medium on the molecular biological properties of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

M.A.Sotnikova, K.V.Khlopova, G.M.Vakhrameeva, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov

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

The causative agent of tularemia, *Francisella tularensis*, is an intracellular parasite, the main factors of pathogenicity of which are the type VI transport system, which contains the IglC protein in the pili. To inactivate reactive oxygen species produced by host cells infected with *F. tularensis*, the bacterium synthesizes the superoxide dismutase enzymes SodB and SodC. In this work, the transcriptional activity of the *sodB*, *sodC* and *iglC* genes was assessed using a quantitative real-time PCR method depending on the growth phase of the vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG and the composition of the nutrient media. It was shown that the level of *iglC* gene mRNA in bacteria cultivated in the BHI medium was significantly higher than the level of *iglC* gene mRNA compared to the ZhPS medium. The *sodB* gene mRNA level in the ZhPS medium did not change regardless of the growth phase, while the *sodB* gene mRNA level in the BHI medium decreased 5-fold upon reaching the stationary phase. The amount of *sodC* gene mRNA in the early and late growth phases in BHI was almost identical, whereas in the ZhPS medium

Для корреспонденции:

Сотникова Мария Александровна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций 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) 36-0117

Статья поступила 02.11.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Maria A. Sotnikova, junior researcher, Laboratory of microbiology of tularemia, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117

The article was received 02.11.2023, accepted for publication 25.12.2023

the amount of *sodC* gene mRNA in the late growth phase was 2.8 times higher compared to the early phase. It was shown that the growth rate of bacteria in the ZhPS nutrient medium was significantly higher compared to the BHI medium. The *F. tularensis* 15 NIIEG culture grown in BHI medium had an increased ability to disseminate in the body of infected BALB/c mice at the early stages of the infectious process. It is proposed to use, along with traditional methods for assessing the effectiveness of nutrient media for the cultivation of vaccine tularemia strains, a modern post-genomic approach, which consists in determining by real-time PCR the transcriptional activity of the genes for the proteins IglC, SodB and SodC, which play an important role in the initiation of the vaccine process.

Key words: *Francisella tularensis* 15 NIIEG, mRNA, *sodB*, *sodC*, *iglC*, nutrient medium, BALB/c mice

For citation: Sotnikova M.A., Khlopova K.V., Vakhrameeva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Pavlov V.M. Influence of the composition of the nutrient medium on the molecular biological properties of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG. *Bacteriology*. 2023; 8(4): 36–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-36-41

Ф акультативный внутриклеточный паразит *Francisella tularensis* является возбудителем туляремии у людей и животных. Для профилактики туляремии у людей в России используют лиофильно высушенную живую вакцину, приготовленную на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Данный штамм отличается от вирулентных природных изолятов *F. tularensis* spp. *holarctica* практически полной авирулентностью для морских свинок и сниженной вирулентностью для белых мышей из-за наличия делеций в хромосоме в районе генов *pilA* и *pilE* и гена липопротеина, соответствующего гену *FTT_0918* подвида *tularensis* [1, 2].

Бактерии *F. tularensis* для защиты от радикалов O²·, вырабатываемых как самими бактериями, так и фагоцитами макроорганизма, синтезируют два вида ферментов: железо-зависимую (FeSOD) и медь/цинк-зависимую (CuZnSOD) супероксид-дисмутазы [3]. Наличие функционально активного гена *sodB*, кодирующего фермент FeSOD в геноме *F. tularensis*, жизненно необходимо для размножения туляремийного микроба *in vitro* и *in vivo* [3], тогда как ген *sodC*, кодирующий фермент CuZnSOD, влияет только на их выживаемость *in vivo* [4].

Существенную роль в патогенности *F. tularensis* играет транспортная система VI типа [5]. Одним из ключевых элементов данной системы является белок IglC, кодируемый геном *iglC*, локализованным на хромосоме в области так называемого «острова патогенности». Вирулентные для человека штаммы туляремийного микроба, в отличие от других видов *F. tularensis*, содержат в хромосоме две копии «острова патогенности» [6]. Делеция обеих копий гена *iglC* в геномах природных изолятов *F. tularensis* приводит к формированию авирулентных для мелких грызунов штаммов бактерий [7, 8].

Показано, что состав питательной среды и условия культивирования влияют на спектр белков, синтезируемых бактериями *F. tularensis* [9]. Так, антигенный спектр бактерий *F. tularensis* LVS, культивированных в жидкой питательной среде BHI, содержащей сердечного-мозгового экстракт, подобен антигенному спектру бактерий, выделенных из инфицированных мышинных макрофагов, но существенно отличается по антигенному спектру бактерий, культивированных в жидкой питательной среде Мюллера–Хинтон [10].

Цель работы заключалась в определении транскрипционной активности генов *sodB*, *sodC* и *iglC* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на разных фазах роста *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидких питательных средах BHI и ЖПС, а также в сравнении ростовых и морфологических параметров изучаемых культур и начальных этапов их диссеминации в организме экспериментальных мышей линии BALB/c.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ («ГКПМ-Оболensk», ФБУН ГНЦ ПМБ). Бактерии культивировали на FT-агаре (ФГУН ГНЦ ПМБ) при 37°C в термостате (Heratherm, Thermo Scientific, США) и в жидких питательных средах: ЖПС на основе гидролизата казеина с добавлением дрожжевого экстракта, цистеина и двухвалентного железа [11] и BHI на основе пептона с добавлением сердечного-мозгового экстракта (HIMEDIA, Индия) в термостатируемой качалке GFL 3032 (Германия) при 37°C и скорости ротации 160 об./мин.

В колбы объемом 100 мл с 10 мл питательной среды вносили бактериальную суспензию ночной агаровой культуры до конечной концентрации 2•10⁸ КОЕ/мл. Оптическую плотность бактериальных культур определяли на фотоколориметре «Экотест 2020» (Россия) при длине волны 595 нм. Изучение морфологии бактериальных клеток, окрашенных фуксином по стандартной методике, проводили с использованием микроскопа с цифровой фотокамерой OLYMPUS VX43 (Япония).

Для оценки уровней синтеза матричных РНК (мРНК) в клетках туляремийного микроба были сконструированы праймеры на основе нуклеотидных последовательностей исследуемых генов (Gen Bank NCBI, CP066295.1) с помощью программного обеспечения Vector NTI (табл. 1).

Праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Для выделения РНК из бактерий *F. tularensis* образцы культур объемом 2 мл отбирали через 4 и 24 ч культивирования. После осаждения бактерий центрифугированием в

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-РВ для детекции уровня транскрипции генов *iglC*, *sodB*, *sodC* и 16S РНК
Table 1. Primers for real-time PCR to detect the level of transcription of the *iglC*, *sodB*, *sodC* and 16S RNA genes

Название праймера / Primer name	Последовательность / Subsequence	Ген-мишень / Target gene
iglCF	5'acaggaatacaagtgccgagacc	<i>iglC</i>
iglCR	5'aaacaccataagtctgttgctc	<i>iglC</i>
SbcF	5'ctaccttagcgttgatgcat	<i>sodB</i>
SbcR	5'gctcagaacaattgccagttt	<i>sodB</i>
SCcF	5'tgagtatgcttctactgtattag	<i>sodC</i>
SCcR	5'tagtctctataactccacacc	<i>sodC</i>
F16S	5'cgtaattcctttgagtttagc	16S PHK
R16S	5'gtgccagcagccgcggtaa	16S PHK

течение 5 мин (центрифуга MiniSpin Eppendorf, Германия, 12 000 об./мин) осадки суспендировали в 80 мкл забуференного физиологического раствора (ЗФР) и выделяли РНК с использованием набора реагентов «РНК-экстран» («Синтол») по инструкции фирмы-производителя. Для удаления примесной ДНК в препаратах РНК полученные образцы обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКаз (Fermentas, Латвия), согласно протоколу производителя. Оценку количества и качества выделенной РНК проводили на сканирующем спектрофотометре NanoDrop UV/visible (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США).

Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали на матрицах РНК с помощью набора реактивов «Реверта-L» («Амплиценс», Россия) по протоколу фирмы-производителя.

ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) по программе: 94°C – 5 мин (1 цикл), 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с (35 циклов). В пробирки объемом 200 мкл вносили: 1 мкл кДНК и 24 мкл ПЦР-смеси (10 пкмоль каждого из пары праймеров, 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green, 2,5 мкл 25 мМ раствора MgCl₂, деионизованная вода до 24 мкл).

Для оценки уровня экспрессии применяли метод сравнения индикаторных пороговых циклов, нормированных по содержащейся в образцах 16S-рРНК.

Оценку начальной стадии диссеминации бактерий *F. tularensis* проводили на мышах линии BALB/c (виварий ГНЦ ПМБ) возрастом 6–8 нед., весом 18–20 г. Мышей (6 самцов в группе) заражали подкожно в дозе 100 м.к. в объеме 0,1 мл. На 2-е и 3-и сутки мышей подвергали эвтаназии, селезенки асептически отбирали и гомогенизировали в 1 мл ЗФР. Суспензии разбавляли в 10 раз стерильным ЗФР, высевали по 10 мкл из каждого разведения на чашки с FT-агаром и инкубировали в течение 72 ч. Работы с микроорганизмами выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [12].

Все стадии исследования с участием животных соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены соответствующими комитетами «Использование современных средств содержания животных» (ФБУН ГНЦ ПМБ №7 от 11.09.2013); «Порядок работы с СПФ животными в современных исследованиях» (ФБУН ГНЦ ПМБ №7 от 11.09.2013).

Каждую пробу в экспериментах исследовали в трех повторях, эксперименты повторяли по меньшей мере дважды. Все статистические расчеты и определение уровней значимости (*p*) были проделаны с помощью программы GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Стандартные отклонения *p* < 0,05 считали статистически значимыми.

Результаты исследования и их обсуждение

Методом ПЦР-РВ нами был проведен сравнительный анализ уровней синтеза мРНК генов *sodB*, *sodC* и *iglC* в бактериях *F. tularensis* 15 НИИЭГ на логарифмической (4 ч) и стационарной (24 ч) фазах роста культуры в средах ВНИ и

Таблица 2. Транскрипционная активность генов *sodB*, *sodC* и *iglC* в бактериях *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидких питательных средах

Table 2. Transcriptional activity of the *sodB*, *sodC* and *iglC* genes in the bacteria *F. tularensis* 15 NIEG in liquid nutrient media

Относительные уровни мРНК генов / Relative mRNA levels of genes						
Гены / Genes	<i>iglC</i>		<i>sodB</i>		<i>sodC</i>	
Питательные среды / Culture media	ЖПС	ВНИ	ЖПС	ВНИ	ЖПС	ВНИ
4 ч роста / 4 hours growth	6,4	8,2	1,0	0,5	0,4	0,3
24 ч роста / 24 hours growth	11,4	42,8	1,1	0,1	1,1	0,4

ЖПС. Относительные уровни кДНК, полученные с мРНК исследуемых генов, нормировали делением количества соответствующей кДНК к количеству кДНК с матрицы 16S РНК. Все полученные значения были увеличены в 10⁴ раз. Результаты приведены в табл. 2.

Из полученных данных следует, что на 4 ч роста уровни синтеза мРНК гена *iglC* в бактериях в питательной среде ВНИ по сравнению со средой ЖПС достоверно не отличались друг от друга, однако при достижении стационарной фазы роста уровень синтеза мРНК гена *iglC* в среде ВНИ существенно возрос и превысил уровень синтеза в среде ЖПС в 3,8 раза.

Количество мРНК гена *sodB* в бактериях через 4 ч роста в среде ЖПС было выше, чем в среде ВНИ, причем данная тенденция сохранялась к 24 ч роста. Уровень мРНК гена *sodB* в среде ВНИ снизился в 5 раз при достижении стационарной фазы роста. Количество мРНК гена *sodC* в бактериях на ранней и поздней фазах роста в ВНИ было практически одинаковым, тогда как в среде ЖПС количество мРНК гена *sodC* на поздней фазе роста было несколько выше по сравнению с ранней фазой (табл. 2).

Анализ динамики роста культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в средах ВНИ и ЖПС показал, что вне зависимости от состава питательной среды штамм демонстрирует экспонен-

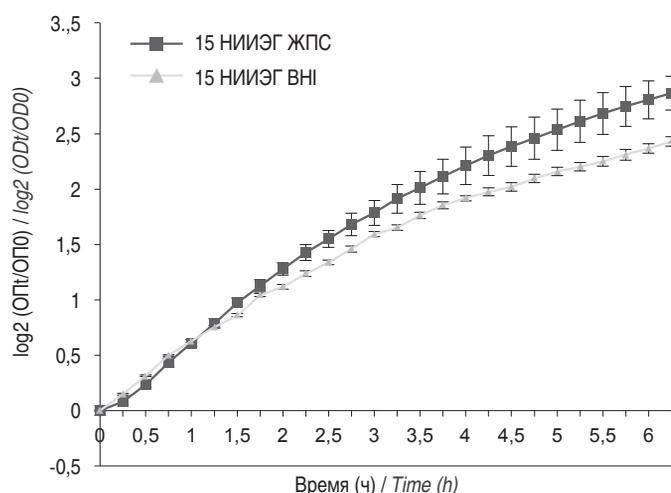


Рис. 1. Динамика роста штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в средах ЖПС и ВНИ: ОПО – оптическая плотность культуральной жидкости в начальный момент культивирования; ОDt – текущее значение оптической плотности.

Fig. 1. Dynamics of growth of the strain *F. tularensis* 15 NIEG in ZhPS and BHI culture media: OD₀ – the optical density of the culture at the initial moment of cultivation; OD_t – current value of optical density.

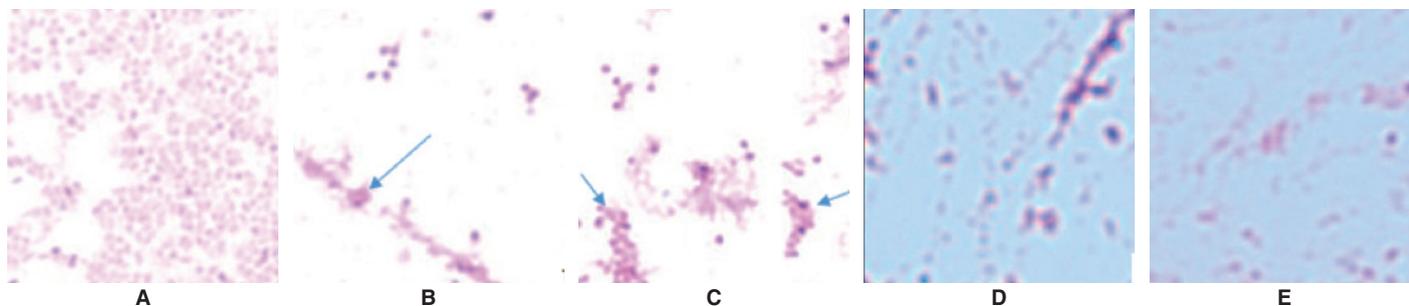


Рис 2. Влияние состава питательных сред и фазы роста культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ на структуру клеточных агрегатов: А – ночная агаровая культура; В – культура через 6 ч роста на среде ВНИ; С – культура через 6 ч роста на среде ЖПС; D – через 24 ч роста на среде ВНИ; E – культура через 24 ч роста на среде ЖПС.

Fig. 2. The influence of the composition of nutrient media and the growth phase of the *F. tularensis* 15 NIIEG culture on the structure of cell aggregates: A – overnight agar culture; B – culture after 6 hours of growth on BHI medium; C – culture after 6 hours of growth on the medium; D – culture after 24 hours of growth on BHI medium; E – culture after 24 hours of growth on ZhPS medium.

циальный рост без выраженного лаг-периода. На начальной стадии скорости роста культур практически идентичны, но по мере увеличения времени культивирования скорость роста культуры в среде ЖПС достоверно опережала скорость роста культуры в среде ВНИ (рис. 1).

Состав питательной среды влияет не только на скорость роста культур, но и на морфологию бактериальных клеточных агрегатов, свойственных туляреминому микробу. Сравнение окрашенных фуксином мазков культур на 6 ч и 24 ч роста показало существенное отличие между образцами, полученными при культивировании на средах ВНИ и ЖПС. В мазке ночной агаровой культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ визуализируются клеточные агрегаты с минимальным количеством изолированных клеток (рис. 2 А). В мазках образцов бактериальной культуры из среды ЖПС к 6 ч наблюдалась начальная агрегация по сравнению с агаровой культурой, а к 24 ч начинали возникать, наряду с крупными аморфными агрегатами, и тяжелоподобные структуры (рис. 2 С, E).

В отличие от среды ЖПС, по мере роста бактерий в среде ВНИ к 6 ч клеточные агрегаты ночной культуры распались на мелкие фрагменты с образованием протяженных вытянутых структур с последующим их укрупнением к 24 ч культивирования (рис. 2 В, D).

Состав жидкой питательной среды влиял не только на культурально-морфологические свойства культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ, но и на способность бактерий к диссеминации в организме экспериментальных мышей линии BALB/c. Количество бактерий, высеваемых из селезенок инфицированных мышей через 2 и 3 суток, приведено в табл. 3.

Полученные данные показали достоверную разницу в бактериальной нагрузке на селезенку мышей для культуры, выращенной в среде ВНИ, по сравнению со средой ЖПС на 3-и сутки после инфицирования.

Таблица 3. Обсемененность селезенок мышей линии BALB/c бактериями *F. tularensis* 15 НИИЭГ после заражения 24-часовыми культурами, выращенными в средах ВНИ и ЖПС

Table 3. Contamination of the spleens of BALB/c mice with *F. tularensis* 15 NIIEG bacteria after infection with 24-hour cultures grown in BHI and ZhPS media

Питательная среда / Nutrient medium	2-е сутки / 2nd day	3-и сутки / 3rd day
ЖПС	116,7 ± 228,7	56,7 ± 111,1
ВНИ	4213,3 ± 5906,6	28160,0 ± 7160,1

Результаты проведенных исследований демонстрируют, что компонентный состав жидкой питательной среды для культивирования *F. tularensis* оказывает существенное влияние на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Нами показано, что скорость размножения бактерий на поздней стадии роста вакцинного штамма 15 НИИЭГ в среде ВНИ с сердечно-мозговым экстрактом ниже, чем в среде ЖПС, содержащий дрожжевой экстракт.

Как известно, основным компонентом среды ВНИ является пептон (ферментативный гидролизат казеина), а среды ЖПС – кислотный гидролизат казеина, обогащенный аминокислотами и короткими пептидами, что благоприятно влияет на ростовые характеристики бактерий, поскольку *F. tularensis* является ауксотрофом по ряду аминокислот, включая гистидин, лизин, метионин, цистеин, аргинин и тирозин [13]. Фактором роста является также витаминно-минеральные компоненты дрожжевого экстракта [11].

Равные скорости роста культур на начальном этапе культивирования можно объяснить присутствием накопленных внутриклеточных метаболитов в посевном материале биомассы ночной агаровой культуры, выращенной на FT-агаре, более богатой среде по сравнению со средой ВНИ.

Состав питательных сред влиял и на морфологию клеточных агрегатов, формирующихся в процессе размножения бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В отличие от среды ЖПС, в среде ВНИ в процессе роста наблюдался более выраженный переход от диффузной структуры клеточных агрегатов, характерной для ночной агаровой культуры, к филаментозным образованиям.

Состав питательных сред влиял также на уровни активности генов *sodB*, *sodC* и *iglC*, важных как для метаболизма туляреминого микроба, так и для приживления и размножения бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* в организме хозяина. Поскольку культивирование бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в среде ВНИ приводило к существенному повышению уровня мРНК гена *iglC* по сравнению со средой ЖПС, причем эта разница усиливалась по мере роста культуры, то можно предположить, что усиление экспрессии гена *iglC* оказывает положительное влияние на факторы, задействованные в процессе диссеминации бактериальных клеток в организме мышей.

Как известно, активные кислородные радикалы O_2^- в эукариотических клетках выполняют двойную роль: в высоких

концентрациях они действуют как бактерицидные факторы, инактивирующие внутриклеточные патогены в результате повреждения молекул ДНК, РНК, липидов и белков, а при низких концентрациях служат вторичными сигнальными молекулами, регулируя экспрессию различных медиаторов воспаления [14, 15]. Ферменты супероксиддисмутазы *sodB* и *sodC* туляремийного микроба вовлечены как в процессы защиты бактерий от бактерицидного действия факторов «окислительного взрыва» макрофагов, так и в процесс подавления активации синтеза медиаторов воспаления в ответ на инфицирование бактериями эукариотических клеток. Более низкий уровень активности супероксиддисмутаз, согласно полученным данным по уровням мРНК генов *sodB* и *sodC*, в среде ВНИ по сравнению со средой ЖПС, вероятно, позволяет бактериям на начальных этапах проникновения в макрофаги за счет более низкой скорости инактивации радикалов O_2^- снизить уровень синтеза медиаторов воспаления, увеличивая время до начала «окислительного взрыва» в макрофагах, тем самым обеспечивая бактериальную экспансию и системную диссеминацию в паренхиматозных органах. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными для мышей линии C57BL/6, инфицированных бактериями *F. tularensis* LVS, культивированными на среде ВНИ и среде Мюллера–Хинтон [8].

Полученные результаты, наряду с традиционными методами оценки эффективности питательных сред для культивирования вакцинных туляремийных штаммов, позволяют предложить современный постгеномный подход, заключающийся в определении методом ПЦР-РВ транскрипционной активности генов белков IgIC, SodB и SodC, играющих важную роль в инициации вакцинального процесса.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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. McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:167-85. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
2. Нарышкина ЕА, Краснов ЯМ, Альхова ЖВ, Баданин ДВ, Осин АВ, Ляшова ОЮ, и др. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020;2:91-97. DOI:10.21055/0370-1069-2020-2-91-97
3. Bakshi CS, Malik M, Regan K, Melendez JA, Metzger DW, Pavlov VM, et al. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol.* 2006 Sep;188(17):6443-8. DOI: 10.1128/JB.00266-06

4. Melillo AA, Mahawar M, Sellati TJ, Malik M, Metzger DW, Melendez JA, et al. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol.* 2009 Oct;191(20):6447-56. DOI: 10.1128/JB.00534-09
5. Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Kwaik YA. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol.* 2005 Jul;7(7):969-79. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00526.x
6. De Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS, Hare RF, Nix EB, Schmerk CL, et al. The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IgIA, IgIB, IgIC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology (Reading).* 2011 Dec;157(Pt 12):3483-3491. DOI: 10.1099/mic.0.052308-0
7. Мокриевич АН, Павлов ВМ, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Бахтеева ИВ, и др. Свойства бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica*, лишенных способности синтезировать белок IgIC. *Бактериология.* 2017;2(4):17-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24
8. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund AL, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2009 Aug;77(8):3424-31. DOI: 10.1128/IAI.00196-09
9. Zarrella TM, Singh A, Bitsaktsis C, Rahman T, Sahay B, Feustel PJ, et al. Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One.* 2011;6(7):e22335. DOI: 10.1371/journal.pone.0022335
10. Kumar S, Sunagar R, Pham G, Franz BJ, Rosa SJ, Hazlett KR, et al. Differential Cultivation of *Francisella tularensis* Induces Changes in the Immune Response to and Protective Efficacy of Whole Cell-Based Inactivated Vaccines. *Front Immunol.* 2017 Jan 10;7:677. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00677
11. Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2009;4(102):66-67. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-66-67
12. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». М., 2021.
13. Svensson K, Larsson P, Johansson D, Byström M, Forsman M, Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(11):3903-8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 1997 Sep;69(3):1330-1. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031330.x
15. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):1-18. DOI: 10.1128/CMR.10.1.1

References

1. McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:167-85. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
2. Naryshkina EA, Krasnov YM, Alhova ZV, Badanin DV, Osin AV, Lyashova OYu, et al. Whole-Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of *Francisella tularensis* Vaccine Strain 15 НИИЭГ. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2020;2:91-97. DOI:10.21055/0370-1069-2020-2-91-97 (In Russian).
3. Bakshi CS, Malik M, Regan K, Melendez JA, Metzger DW, Pavlov VM, et al. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol.* 2006 Sep;188(17):6443-8. DOI: 10.1128/JB.00266-06
4. Melillo AA, Mahawar M, Sellati TJ, Malik M, Metzger DW, Melendez JA, et al. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide

- dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol.* 2009 Oct;191(20):6447-56. DOI: 10.1128/JB.00534-09
5. Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Kwai YA. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol.* 2005 Jul;7(7):969-79. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00526.x
6. de Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS, Hare RF, Nix EB, Schmerk CL, et al. The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IgIA, IgIB, IgIC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology (Reading).* 2011 Dec;157(Pt 12):3483-3491. DOI: 10.1099/mic.0.052308-0
7. Mokrievich AN, Pavlov VM, Vakhrameeva GM, Mironova RI, Kombarova TI, Bakhteeva IV, et al. Properties of *F. tularensis* subsp. *holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize igIC protein. *Bacteriology.* 2017;2(4):17-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24 (In Russian).
8. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund AL, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2009 Aug;77(8):3424-31. DOI: 10.1128/IAI.00196-09
9. Zarella TM, Singh A, Bitsaktsis C, Rahman T, Sahay B, Feustel PJ, et al. Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One.* 2011;6(7):e22335. DOI: 10.1371/journal.pone.0022335
10. Kumar S, Sunagar R, Pham G, Franz BJ, Rosa SJ, Hazlett KR, et al. Differential Cultivation of *Francisella tularensis* Induces Changes in the Immune Response to and Protective Efficacy of Whole Cell-Based Inactivated Vaccines. *Front Immunol.* 2017 Jan 10;7:677. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00677
11. Lapin AA, Pavlov VM, Mokrievich AN, Domotenko LV, Khramov MV. Simple liquid nutrient medium for molecular genetic investigations of *Francisella tularensis*. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2009;4(102):66-67. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-66-67 (In Russian).
12. SanPiN 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Moscow, 2021. (In Russian).
13. Svensson K, Larsson P, Johansson D, Byström M, Forsman M, Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(11):3903-8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 1997 Sep;69(3):1330-1. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031330.x
15. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):1-18. DOI: 10.1128/CMR.10.1.1

Информация о соавторах:

Хлопова Ксения Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Вахрамеева Галина Михайловна, научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кравченко Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Павлов Виталий Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Ksenia V. Khlopova, Junior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Galina M. Vakhrameeva, Researcher of the Laboratory of Microbiology of Tularemia, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Tatyana B. Kravchenko, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Laboratory of Microbiology of Anthrax, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Vitaly M. Pavlov, PhD, DSc (Biological Sciences), Head of the Laboratory of Tularemia Microbiology, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Нераскрытый потенциал бактериальных соединений и генов, связанных с токсином, вызывающим рак толстой кишки

In silico разработка генома обеспечивает легкий доступ к кластерам генов биосинтеза вторичных метаболитов (BGC), кодирующим биосинтез многих биологически активных соединений, которые являются основой для многих важных лекарств, используемых в медицине. Проанализировано 3889 геномов энтеробактерий и обнаружено 13 266 BGC, представленных 252 различными семействами BGC и 347 дополнительными одиночками. Анализ пангенома выявил 88 генов, предположительно связанных со специфическим BGC, кодирующим связанный с раком толстой кишки колибактин, который кодирует различные метаболические и регуляторные функции. Представленный рабочий процесс открывает возможность обнаружения новых вторичных метаболитов, лучшего понимания их физиологической роли и предоставляет руководство по идентификации и анализу наборов генов, связанных с BGC.



Mohite OS, et al.

Pangenome analysis of Enterobacteria reveals richness of secondary metabolite gene clusters and their associated gene sets. Synthetic and Systems Biotechnology. 2022;(7):900-10.

ICEVpaRus – новый ICE-элемент *Vibrio parahaemolyticus*

С.О.Водопьянов, О.С.Чемисова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, М.М.Сагакянц, О.А.Цырулина

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Для выявления интегративных конъюгативных элементов (ICE) *Vibrio parahaemolyticus* сконструированы праймеры, фланкирующие место интеграции ICE в 5' конец гена *pfrC3*. В случае интактного гена *pfrC3* при проведении полимеразной цепной реакции формируется фрагмент размером 478 п.о., в случае вставки ICE продукт амплификации отсутствует. При анализе коллекции из 14 культур *V. parahaemolyticus* обнаружено отсутствие ампликона при анализе ДНК из штамма 19632. Проведенный полногеномный сиквенс этого штамма и последующий биоинформационный анализ показал, что у него между 5' и 3' концами гена *pfrC3* встроен ICE-элемент размером 71 684 п.о., обозначенный нами как ICEVpaRus и кодирующий 91 ген. В составе идентифицированного ICEVpaRus и двух ранее описанных ICE элементов *V. parahaemolyticus* ICEVpaCan1 и IECVpaTF2 не идентифицирован ни один из генов антибиотикорезистентности. Анализ идентифицированных генов показал высокую степень уникальности белков для каждого ICE, а также присутствие значительного числа гипотетических протеинов, т.е. белков с не установленной на данный момент функцией.

Ключевые слова: *Vibrio parahaemolyticus*, интегративные конъюгативные элементы, ICE, праймеры, ген *pfrC3*

Для цитирования: Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Сагакянц М.М., Цырулина О.А. ICEVpaRus – новый ICE-элемент *Vibrio parahaemolyticus*. Бактериология. 2023; 8(4): 42–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-42-46

ICEVpaRus – new ICE element *Vibrio parahaemolyticus*

S.O.Vodopyanov, O.S.Chemisova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, M.M.Sagakyants, O.A.Tsyurulina

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

To identify integrative conjugative elements (ICE) of *Vibrio parahaemolyticus*, primers flanking the place of integration of ICE into the 5' end of the *pfrC3* gene were constructed. In the case of an intact *pfrC3* gene, a fragment with a size of 478 bp is formed during PCR, in the case of ICE insertion, there is no amplification product. When analyzing a collection of 14 cultures of *V. parahaemolyticus*, the absence of an amplicon was found when analyzing DNA from strain 19632. A full-genome sequence of this strain and subsequent bioinformatic analysis showed that it has an ICE element embedded between the 5' and 3' ends of the *pfrC3* gene, designated by us as ICEVpaRus with a size of 71,684 bp and encoding 91 genes. None of the antibiotic resistance genes were identified in the identified ICEVpaRus and two previously described ICE elements of *V. parahaemolyticus* ICEVpaCan1 and IECVpaTF2. The analysis of the identified genes showed a high degree of uniqueness of proteins for each ICE, as well as the presence of a significant number of hypothetical proteins, i.e. proteins with currently unknown function.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, integrative conjugative elements, ICE, primers, *pfrC3* gene

For citation: Vodopyanov S.O., Chemisova O.S., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Sagakyants M.M., Tsyurulina O.A. ICEVpaRus – new ICE element *Vibrio parahaemolyticus*. Bacteriology. 2023; 8(4): 42–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-42-46

V*ibrio parahaemolyticus* – граммотрицательная галофильная бактерия, которая является основной причиной диарейных заболеваний, связанных с морепродуктами [1], септицемией и раневой инфекцией [2, 3]. Интегративные конъюгативные элементы (ICE) представляют собой мобильные генетические элементы, способные к горизонтальному переносу и кодирующие широкий спектр генетической информации, включая устойчивость к антибиотикам и тяже-

лым металлам [4]. Значение ICE в биологии *Vibrio cholerae* и реализации патогенного потенциала, включая резистентность к антибиотикам, изучены достаточно полно [5–7].

На этом фоне роль ICE в случае *V. parahaemolyticus* исследована чрезвычайно слабо. Имеющиеся немногочисленные данные противоречивы. Так, среди 594 изолятов *V. parahaemolyticus* из культивируемых устриц и эстуарной воды, несмотря на наличие 74,1% изолятов с устойчивостью к

Для корреспонденции:

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела диагностики холеры и других острых кишечных инфекций (ОКИ) ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117
Телефон: (863) 240-2703

Статья поступила 17.08.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Department of Diagnostics of Cholera and Other Acute Intestinal Infections of the Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-2703

The article was received 17.08.2023, accepted for publication 25.12.2023

одному антибиотику и 13,5% изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, не было выявлено ни одного ICE-элемента [8]. В то же время 59 из 997 изолятов из пресноводных креветок (5,9%) были предположительно ICE-позитивными по наличию положительного результата в полимеразной цепной реакции (ПЦР) на присутствие пяти генов, характерных для SXT/R391-подобных ICE (*int*, *attR*, *traC*, *setR* и *traI*). Интересен тот факт, что устойчивость *V. parahaemolyticus* к тяжелым металлам была характерна для ICE-положительных штаммов с более чем восемью маркерами устойчивости к антибиотикам [4]. Имеются сообщения о возможном присутствии ICE, лишенных генов устойчивости к антибиотикам, в трех изолятах *V. parahaemolyticus*, выделенных из воды моллюсков в 2002–2003 гг. в Мозамбике [9].

Однако в глобальной базе данных ICE-элементов ICEberg2 [10] присутствует всего один охарактеризованный ICE-элемент *V. parahaemolyticus* – ICEVpaCan1, выявленный в штамме *V. parahaemolyticus* S107-1 [11], при этом в GenBank также представлен еще один ICE-элемент ICEVpaTF2, выявленный в штамме TF2 (NCBIAccessionNumberMN201567). Очевидно, подобная ситуация обусловлена отсутствием методики выявления и идентификации ICE-элементов *V. parahaemolyticus*.

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в разработке алгоритма поиска ICE-элементов у *V. parahaemolyticus* и его апробации на наборе штаммов.

Материалы и методы

В работе использованы 14 штаммов *V. parahaemolyticus* 19632, P-14810, 19366, 20647, 20404, 19744, 19529, 19394, 19379, 19234, 19167, 19016, 19008, 19014 из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Штаммы культивировали 24–48 ч на агаре Мартена с 2% хлорида натрия при 37°C.

Полногеномное секвенирование штаммов *V. parahaemolyticus* проведено в ходе выполнения стратегической инициативы социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» на платформе MiSeq (Illumina, США) и OxfordNanopore (США). Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [12]. Полногеномные сиквенсы *V. parahaemolyticus* также были получены из базы данных NCBI. Поиск открытых рамок считывания проводили с использованием программы Glimmer3 [13]. Для аннотации и идентификации генов использовали программу blastx из пакета BLAST+ с использованием последовательностей референсных генов, полученных из базы данных uniprot.org [14]. Визуализацию расположения генов проводили с использованием пакета ruGenomeViz [15]. Условия проведения ПЦР (15 циклов амплификации) и учета результатов описаны ранее [16].

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что ICE различных микроорганизмов могут интегрироваться в самые различные сайты, при этом для не-

которых ICE-элементов сайт прикрепления часто находится в гене тРНК [17, 18]. Однако в случае *V. cholerae* ICE элемент стабильно интегрируется в 5' конец гена *pfrC3* размером 1590 п.о., детерминирующего белковый продукт peptide chain release factor 3 размером 529 аминокислот [7, 19].

Мы предположили, что эта закономерность интеграции ICE-элементов в геноме холерного вибриона свойственна и для близкородственного *V. parahaemolyticus*. Предварительный биоинформационный анализ показал, что гены *pfrC3* *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus* совпадают по нуклеотидной и аминокислотной последовательности продуктов на 78 и 88% соответственно, а совпадение по гену интегразы ICE-элементов достигает 96–98%.

В связи с этим нами для выявления состояния гена *pfrC3* *V. parahaemolyticus* (нативный или наличие вставки) были сконструированы праймеры (прямой: CGAGAATACCGCG CAAAATTG и обратный: CAGACGTGTTACTTCCATTAGCT), фланкирующие место предположительной интеграции ICE-элемента. В случае интактного гена *pfrC3* при использовании данных праймеров формируется фрагмент размером 478 п.о., в случае вставки размер ожидаемого фрагмента превышает 50 т.п.о. поскольку содержит в своем составе последовательность интегрированного ICE-элемента, что приводит к отсутствию продукта амплификации. Этот методический прием *in vitro* был успешно использован ранее для выявления встраивания генетического островка VcB во вторую хромосому *V. cholerae* [16].

Результат амплификации с праймерами, фланкирующими участок гена *pfrC3*, представленный на рис. 1, показал отсутствие специфического ампликона в случае проведения ПЦР-анализа ДНК штамма 19632 (рис. 1, лунка 1). При изучении остальных 13 штаммов *V. parahaemolyticus* из рабочей коллекции регистрировали появление целевого продукта (рис. 1, лунки 2–4). Данный результат расценивался нами как факт наличия большой вставки в ген *pfrC3* в геноме только штамма *V. parahaemolyticus* 19632.

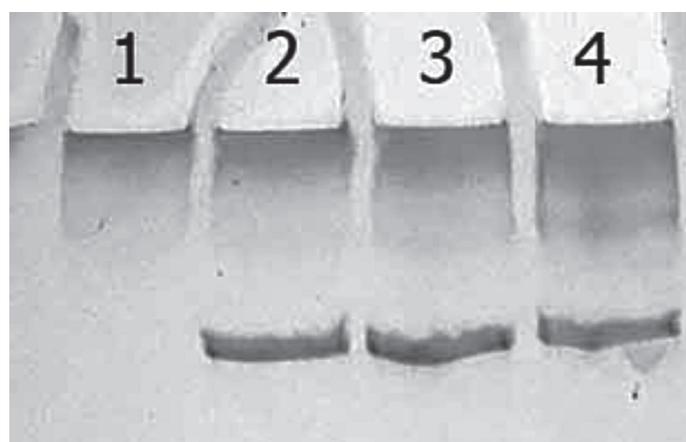


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК штаммов *V. parahaemolyticus* с праймерами, фланкирующими участок гена *pfrC3*, в геле 8% полиакриламида. Лунки 1–4: результат реакции со штаммами 19632, P-14810, 19366, 20647. Специфический ампликон присутствует только в лунках 2, 3 и 4.
Fig. 1. Electrophoregram of PCR DNA products of *V. parahaemolyticus* strains with primers flanking a section of the *pfrC3* gene in a gel of 8% polyacrylamide. Wells 1–4: result of reaction with strains 19632, P-14810, 19366, 20647. The specific amplicon is present only in wells 2, 3 and 4.

Таблица. Характеристика генов, идентифицированных в составе ICE-элементов *V. parahaemolyticus*
 Table. Characteristics of the genes identified in the composition of the ICE elements of *V. parahaemolyticus*

Характеристика генов, детерминируемых ICE / Characteristics of genes determined by ICE	Тип ICE-элемента / ICE-element type		
	ICEVpaCan1	ICEVpaRus	ICEVpaTF2
Специфичен для ICEVpaCan1 / Specific to ICEVpaCan1	22		
Специфичен для ICEVpaRus / Specific to ICEVpaRus		27	
Специфичен для ICEVpaTF2 / Specific to ICEVpaTF2			23
Гипотетические протеины / Hypothetical proteins	18	14	21

В связи с этим нами был проведен сиквенс штамма *V. parahaemolyticus* 19632 с предположительной вставкой и 13 «нативных» штаммов, несущих по данным ПЦР интактный ген *pfrC3*. Для получения более достоверных результатов сиквенс каждого штамма проведен дважды на двух платформах: Illumina MiSeq и Oxford Nanopore, что дало возможность собрать гибридные последовательности геномов.

Биоинформационный анализ полученных гибридных последовательностей показал, что между 5' и 3' концами гена *pfrC3* в геноме штамма 19632 встроены ICE-элемент, обозначенный нами как ICEVpaRus. В геномах 13 «нативных» штаммов, как и предполагали, присутствовал интактный ген *pfrC*. Штамм *V. parahaemolyticus* 19632, выделенный в 2013 г. из морской воды на пляже г. Новороссийска, не содержал генов *tdh* и *trh*.

Проведен сравнительный анализ геномного состава обнаруженного ICEVpaRus и двух известных элементов – ICEVpaTF2 и ICEVpaCan1, показавший существенное различие в локализации и структуре генов (рис. 2). Размеры генетических структур составили: ICEVpaCan1 – 81 492 п.о., ICEVpaTF2 – 83 588 п.о. Выявленный нами у штамма *V. parahaemolyticus* 19632 ICEVpaRus имел размер 71 684 п.о. В структуре трех ICE-элементов *V. parahaemolyticus* идентифи-

фицировано 143 гена, при этом в составе ICEVpaCan1 и ICEVpaRus был выявлен 91 ген, а в ICEVpaTF2 – 93 гена. Общими для всех трех ICE-элементов был 61 ген. Интересно отметить, что ни в одном из изученных ICE-элементов *V. parahaemolyticus* программой blastx не идентифицирован ни один из генов антибиотикорезистентности, что согласуется с данными об отсутствии связи между резистентностью *V. parahaemolyticus* к антибиотикам и наличием ICE-элемента [8, 9]. Эти результаты противоречат известным данным о роли ICE-элементов *V. cholerae* в детерминировании устойчивости к антибиотикам [6, 7, 20]. Анализ идентифицированных генов показал высокую степень уникальности белков в составе изученных ICE-элементов. Число уникальных генов для каждого ICE элемента составило 22, 27 и 23 соответственно (таблица). Кроме того, интересен факт присутствия значительного числа гипотетических протеинов, т.е. белков с неустановленной на данный момент функцией. Вероятно участие подобных структур, входящих в состав ICE-элементов *V. parahaemolyticus*, в реализации новых признаков, в т.ч. в обеспечении резистентности хозяина к токсическому воздействию ионов тяжелых металлов [21–23].

Заключение

Таким образом, на основании проведенной работы предложен алгоритм поиска ICE-элементов *V. parahaemolyticus*, основанный на отборе с помощью сконструированных праймеров штаммов, содержащих вставку в ген *pfrC*, и их последующего секвенирования. В результате использования предложенного алгоритма у *V. parahaemolyticus* идентифицирован новый ICE – ICEVpaRus, содержащий 91 ген, но не содержащий генов антибиотикорезистентности. В противовес *V. cholerae*, в случае *V. parahaemolyticus* все охарактеризованные на данный момент ICE-элементы не содержат детерминант устойчивости к антибиотикам. Возможная роль ICE-элементов в биологии этого возбудителя пока не ясна и нуждается в дальнейшем изучении, в т.ч. в плане возможной толерантности возбудителя к воздействию тяжелых металлов.

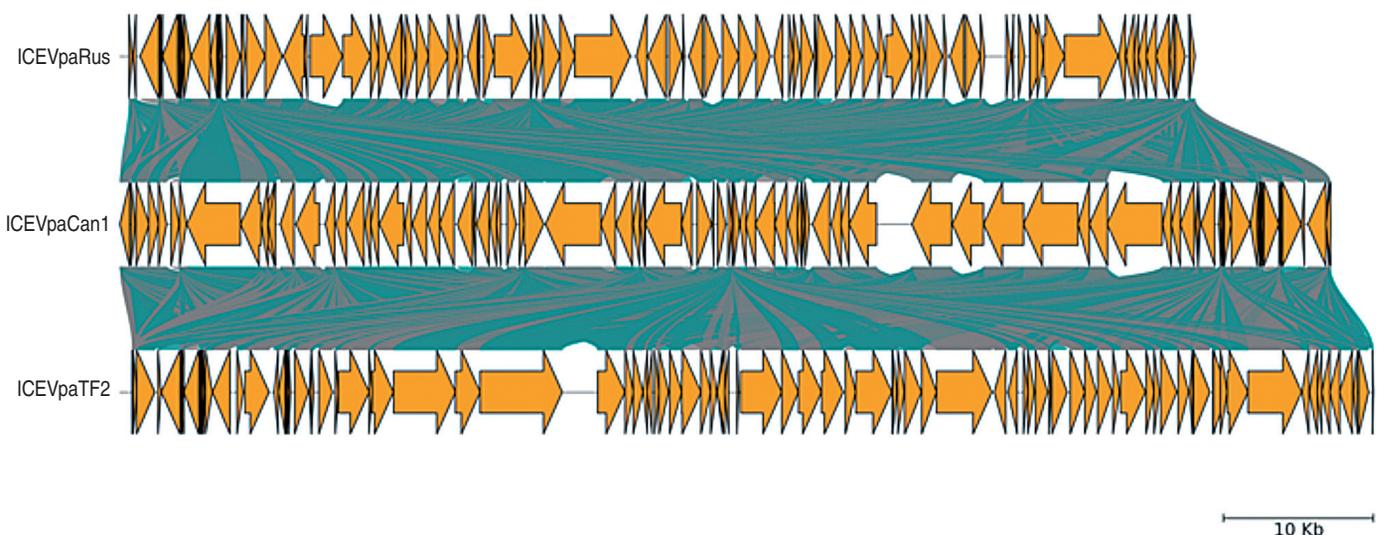


Рис. 2. Сравнение структуры трех ICE-элементов *V. parahaemolyticus*.
 Fig. 2. Comparison of the structure of three ICE elements of *V. parahaemolyticus*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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

- Li L, Meng H, Gu D, Li Y, Jia M. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiol Res.* 2019;222:43-51. DOI: 10.1016/j.micres.2019.03.003
- Raszl SM, Froelich BA, Vieira CR, Blackwood AD, Noble RT. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. *J Appl Microbiol.* 2016;121(5):1201-1222. DOI: 10.1111/jam.13246
- Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front Microbiol.* 2014;11;5:705. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00705
- He Yu, Wang S, Zhang J, Zhang X, Sun F, He B, et al. Integrative and conjugative elements-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquaculture shrimp in Jiangsu, China. *Front Microbiol.* 2019;10:1574. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01574
- Селянская НА, Водопьянов СО, Рыкова ВА, Соколова ЕП. Трансмиссивная антибиотикоустойчивость, обусловленная SXT-элементом, у холерных вибрионов, выделенных на территории России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020;97(3):258-264. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-8
- Рыбальченко ДА, Щелканова ЕЮ, Лозовский ЮВ, Федоров АВ, Смирнова НИ. Распространенность разных типов интегративного конъюгативного элемента SXT/R391, кодирующего множественную резистентность к антибиотикам, среди клинических штаммов возбудителя холеры. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022;1:137-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-137-147
- Захарова ИБ, Викторов ДВ. Интегративные конъюгативные элементы микроорганизмов (ICEs). *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2015;33(3):9-16.
- Jeamsripong S, Khant W, Chuanchuen R. Distribution of phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultivated oysters and estuarine water. *FEMS Microbiol Ecol.* 2020 Aug 1;96(8):fiaa081. DOI: 10.1093/femsec/fiaa081
- Elisa Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, Bani S, Cappuccinelli P, Colwell RR, et al. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008; 64(1):45-54. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00455
- Liu M, Li X, Xie Y, Bi D, Sun J, Li J, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D660-D665. DOI: 10.1093/nar/gky1123
- Bioteau A, Durand R, Burrus V. Redefinition and Unification of the SXT/R391 Family of Integrative and Conjugative Elements. *Appl Environ Microbiol.* 2018;18;84(13):e00485-18. DOI: 10.1128/AEM.00485-1
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
- Delcher AL, Bratke KA, Powers TC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics.* 2007;15;23(6):673-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm009

- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009 Dec 15;10:421. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421
- Shimoyama Y. pyGenomeViz: A genome visualization python package for comparative genomics [Computer software]. (2022). Available at: <https://github.com/moshi4/pyGenomeViz>
- Водопьянов АС, Водопьянов СО, Мишанькин БН, Олейников ИП, Дуванова ОВ. Корреляция между наличием области варибельного tandemного повтораVcb и островком патогенности VPI-1 у *Vibrio cholerae*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017;35(2):49-52. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-2-49-52
- Johnson CM, Grossman AD. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet.* 2015;49:577-601. DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-055018
- Gonçalves OS, de Assis JCS, Santana MF. Breaking the ICE: an easy workflow for identifying and analyzing integrative and conjugative elements in bacterial genomes. *Funct Integr Genomics.* 2022 Dec;22(6):1139-1145. DOI: 10.1007/s10142-022-00903-2
- Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Nov;45(11):2991-3000. DOI: 10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001
- Dutta D, Kaushik A, Kumar D, Bag S. Foodborne pathogenic vibrios: antimicrobial resistance. *Front Microbiol.* 2021;12:638331. DOI: 10.3389/fmicb.2021.638331
- Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, et al. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River estuary, China. *BMC Microbiol.* 2013;13:214. DOI: 10.1186/1471-2180-13-214
- Jiang H, Yu T, Yang Y, Yu S, Wu J, Lin R, et al. Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance and sequence type diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus vannamei* at freshwater farms, seawater farms, and markets in Zhejiang Province, China. *Front Microbiol.* 2020;11:1294. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01294
- Fang J, Cheng H, Yu T, Jiang H. Occurrence of virulence factors and antibiotic and heavy metal resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Pacific mackerel at markets in Zhejiang, China. *J Food Prot.* 2020; 83(8):1411-1419. DOI:10.4315/JFP-20-091

References

- Li L, Meng H, Gu D, Li Y, Jia M. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiol Res.* 2019;222:43-51. DOI: 10.1016/j.micres.2019.03.003
- Raszl SM, Froelich BA, Vieira CR, Blackwood AD, Noble RT. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. *J Appl Microbiol.* 2016;121(5):1201-1222. DOI: 10.1111/jam.13246
- Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front Microbiol.* 2014;11;5:705. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00705
- He Yu, Wang S, Zhang J, Zhang X, Sun F, He B, et al. Integrative and conjugative elements-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquaculture shrimp in Jiangsu, China. *Front Microbiol.* 2019;10:1574. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01574
- Selyanskaya NA, Vodop'yanov SO, Rykova VA, Sokolova EP. Transmissible antibiotic resistance, associated with the SXT element, in cholera vibrios isolated in the territory of Russia. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(3):258-264. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-8 (In Russian).
- Rybal'chenko DA, Shchelkanova EYu, Lozovsky YuV, Fedorov AV, Sмирнова NI. Prevalence of Different Types of Integrative Conjugative Element SXT/R391 Encoding Multiple Antibiotic Resistance Among Clinical Strains of Cholera Agent.

- Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;1:137-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-137-147 (In Russian).
7. Zakharova IB, Viktorov DV. Integrative conjugative elements of microorganisms (ICEs). Molecular genetics, microbiology and virology. 2015;33(3):9-16. (In Russian).
 8. Jearnsripong S, Khant W, Chuanchuen R. Distribution of phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultivated oysters and estuarine water. FEMS Microbiol Ecol. 2020 Aug 1;96(8):fiae081. DOI: 10.1093/femsec/fiae081
 9. Elisa Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, Bani S, Cappuccinelli P, Colwell RR, et al. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. FEMS Microbiol. Ecol. 2008; 64(1):45-54. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00455
 10. Liu M, Li X, Xie Y, Bi D, Sun J, Li J, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D660-D665. DOI: 10.1093/nar/gky1123
 11. Bioteau A, Durand R, Burrus V. Redefinition and Unification of the SXT/R391 Family of Integrative and Conjugative Elements. Appl. Environ. Microbiol. 2018;18;84(13):e00485-18. DOI: 10.1128/AEM.00485-1
 12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
 13. Delcher AL, Bratke KA, Powers TC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. Bioinformatics. 2007; 15;23(6):673-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm009
 14. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics. 2009 Dec 15;10:421. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421
 15. Shimoyama Y. pyGenomeViz: A genome visualization python package for comparative genomics [Computer software]. (2022). Available at: <https://github.com/moshi4/pyGenomeViz>
 16. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Mishankin BN, Oleinikov IP, Duvanova OV. Correlation between the presence of a variable tandem repeat of VcB and the island of VPI-1 pathogenicity in *Vibrio cholerae*. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2017;35(2):49-52. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-2-49-52 (In Russian).
 17. Johnson CM, Grossman AD. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. Annu Rev Genet. 2015;49:577-601. DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-055018
 18. Gonçalves OS, de Assis JCS, Santana MF. Breaking the ICE: an easy workflow for identifying and analyzing integrative and conjugative elements in bacterial genomes. Funct Integr Genomics. 2022 Dec;22(6):1139-1145. DOI: 10.1007/s10142-022-00903-2
 19. Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Nov;45(11):2991-3000. DOI: 10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001
 20. Dutta D, Kaushik A, Kumar D, Bag S. Foodborne pathogenic vibrios: antimicrobial resistance. Front Microbiol. 2021;12:638331. DOI: 10.3389/fmicb.2021.638331
 21. Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, et al. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River estuary, China. BMC Microbiol. 2013;13:214. DOI: 10.1186/1471-2180-13-214
 22. Jiang H, Yu T, Yang Y, Yu S, Wu J, Lin R, et al. Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance and sequence type diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus vannamei* at freshwater farms, seawater farms, and markets in Zhejiang Province, China. Front Microbiol. 2020;11:1294. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01294
 23. Fang J, Cheng H, Yu T, Jiang H. Occurrence of virulence factors and antibiotic and heavy metal resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Pacific mackerel at markets in Zhejiang, China. J Food Prot. 2020; 83(8):1411-1419. DOI:10.4315/JFP-20-091
-
- Информация о соавторах:**
Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего «Музеем живых культур с Центром патогенных для человека холерных вибрионов»; ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
- Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций; ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
- Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций; ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
- Сагакянц Маргарита Маргаритосовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник «Музея живых культур с Центром патогенных для человека холерных вибрионов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
- Цырулина Оксана Алексеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник «Музея живых культур с Центром патогенных для человека холерных вибрионов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
-
- Information about co-authors:**
Olga S. Chemisova, PhD in Biological Sciences, leading researcher, acting head of the «Museum of Living Cultures with the Center for *Vibrio Cholerae* Pathogenic to Humans»; FKUZ «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of Rosptrebnadzor
- Alexey S. Vodopyanov, MD, PhD, leading researcher at the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections; FKUZ «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of Rosptrebnadzor
- Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, leading researcher, acting head of the laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections; FKUZ «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of Rosptrebnadzor
- Margarita M. Sagakyants, PhD in Biological Sciences, Researcher at the «Museum of Living Cultures with the Center for *Vibrio Cholerae* Pathogenic to Humans», Federal Public Health Institution «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of Rosptrebnadzor
- Oksana A. Tsyruлина, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, «Museum of Living Cultures with the Center for *Vibrio Cholerae* Pathogenic to Humans», Federal Public Health Institution «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of Rosptrebnadzor

CRISPR/Cas-белки для выявления генов антибиотикоустойчивости у патогенных микроорганизмов

М.А.Тюменцева, А.И.Тюменцев, А.Н.Преловская, В.Г.Акимкин

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

Для решения эпидемиологических задач по расшифровке вспышек инфекционных болезней, выявления и идентификации возбудителя, а также детекции специфических бактериальных генов необходимы разработка и внедрение в практику работы надзорных и мониторинговых служб современных технологий молекулярной эпидемиологии. Одной из таких технологий является использование элементов генетического редактирования системы CRISPR/Cas. В настоящей работе разработаны направляющие РНК, которые могут быть использованы в системе CRISPR/Cas12 в составе рибонуклеопротеиновых комплексов для выявления единичных копий генов антибиотикоустойчивости патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: CRISPR/Cas-нуклеаза, направляющая РНК, рибонуклеопротеиновый комплекс CRISPR/Cas, предварительная амплификация, ген антибиотикоустойчивости

Для цитирования: Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Преловская А.Н., Акимкин В.Г. CRISPR/Cas-белки для выявления генов антибиотикоустойчивости у патогенных микроорганизмов. Бактериология. 2023; 8(4): 47–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-47-50

CRISPR/Cas proteins for detecting antibiotic resistance genes in pathogenic microorganisms

M.A.Tyumentseva, A.I.Tyumentsev, A.N.Prelovskaya, V.G.Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор, Moscow, Russian Federation

To solve epidemiological problems of deciphering outbreaks of infectious diseases, identifying pathogens, as well as detecting specific bacterial genes, it is necessary to develop and implement modern technologies of molecular epidemiology into the practice of surveillance and monitoring services. One of these technologies is the use of genetic editing elements of the CRISPR/Cas system. In this work, guide RNAs have been developed that can be used in the CRISPR/Cas12 system as part of ribonucleoprotein complexes to identify single copies of antibiotic resistance genes in pathogenic microorganisms.

Key words: CRISPR/Cas nuclease, guide RNA, CRISPR/Cas ribonucleoprotein complex, pre-amplification, antibiotic resistance gene

For citation: Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Prelovskaya A.N., Akimkin V.G. CRISPR/Cas proteins for detecting antibiotic resistance genes in pathogenic microorganisms. Bacteriology. 2023; 8(4): 47–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-47-50

В 2018 г. было показано, что один из ферментов CRISPR-системы – Cas12 – после распознавания своей целевой ДНК-мишени начинает неспецифически гидролизовать одноцепочечную ДНК. Такое свойство Cas12 можно использовать в качестве индикатора присутствия определенной мишени, например генома вируса или бактерии. Исследователи использовали это открытие для создания технологической платформы обнаружения нуклеиновых кислот DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter). Впервые DETECTR была использована для выявления и генотипирования вируса папилломы человека (HPV). Предложенная платформа объединяет нуклеазу

Cas12a, ее направляющую РНК, специфичную к нуклеиновой кислоте HPV, и флуоресцентную репортерную молекулу. Технология DETECTR используется для обнаружения целевой ДНК-мишени после предварительной амплификации [1]. Не менее важным приложением системы CRISPR/Cas является идентификация бактериальных патогенов и детекция специфических бактериальных генов. Так, например, с помощью платформы SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) удалось корректно генотипировать ряд штаммов *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* при низкой перекрестной реактивности. Кроме того, платформа SHERLOCK была использована для диф-

Для корреспонденции:

Тюменцева Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией геномного редактирования Отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А
Телефон: (495) 974-9646

Статья поступила 30.11.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Marina A. Tyumentseva, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Genome Editing, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор

Address: 3A Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation
Phone: (495) 974-9646

The article was received 30.11.2023, accepted for publication 25.12.2023

ференциации клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с двумя различными генами антибиотикоустойчивости, что открывает значительные перспективы создания мультиплексных систем для одновременной идентификации бактериальных патогенов и выявления у них генов антибиотикоустойчивости [2].

Антибиотикоустойчивые патогенные микроорганизмы стали проблемой современного здравоохранения, так как устойчивость к антибиотикам приводит к увеличению медицинских расходов, длительному пребыванию в больнице и увеличению смертности. В связи с этим крайне актуальной является задача разработки новых эффективных методик выявления генов антибиотикоустойчивости у бактериальных патогенов, основанных на генетических технологиях, таких как CRISPR/Cas.

Материалы и методы

В работе использовались методы амплификации нуклеиновых кислот, в т.ч. с детекцией флуоресценции в режиме реального времени.

Подбор последовательностей-мишеней в генах антибиотикоустойчивости для создания направляющих РНК проводили с использованием современных алгоритмов *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей и программ, находящихся в открытом доступе, включая Benchling (<https://www.benchling.com/molecular-biology/>).

В качестве модельных матриц генов антибиотикоустойчивости использовали плазмидные ДНК pGEM-T, содержащие в своем составе фрагменты соответствующих генов антибиотикоустойчивости.

Предварительную амплификацию участков, соответствующих генам антибиотикоустойчивости, проводили с использованием ПЦР-смеси-2 blue (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) и специфических олигонуклеотидов [3, 4]. В ходе пробоподготовки для предварительной амплификации проводили титрование модельных матриц путем приготовления серийных разведений. Температурный профиль амплификации для получения ПЦР-продуктов, кодирующих фрагменты генов антибиотикоустойчивости: начальная денатурация 95°C в течение 3 мин; 40 циклов амплификации 95°C – 15 с, 55°C – 45 с, 72°C – 30 с; финальная элонгация: 72°C в течение 5 мин. Эффективность предварительной амплификации полученных фрагментов генов антибиотикоустойчивости оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле. Амплифицированный материал без предварительной очистки использовали для экспериментов по выявлению генов антибиотикоустойчивости с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов LbCpf1 из *Lachnospiraceae*, содержащих направляющие РНК sgRNA [3, 4].

Синтез направляющих РНК для обнаружения генов антибиотикоустойчивости и создание готовых рибонуклеопротеиновых комплексов, содержащих белок семейства CRISPR/Cas LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и направляющую РНК, проводили как описано ранее [5].

Для обнаружения генов антибиотикоустойчивости готовили реакционную смесь, содержащую 250 нг рибонуклеопротеинового комплекса (LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и направляющая РНК), 20 pmol флуоресцентного зонда 6FAM-TTATT-

BHQ1 и предварительно амплифицированный фрагмент соответствующего гена антибиотикоустойчивости. Реакционные смеси, содержащие все необходимые компоненты, помещали в амплификатор «ДТПрайм 5» («ДНК-Технология», Россия) и задавали следующие параметры реакции: 60 циклов; 37°C – 35 с, 37°C – 25 с со съемкой флуоресценции.

Результаты исследования и их обсуждение

Для каждого гена (*bla*_{VIM-2} *P. aeruginosa*, *mecA* *Staphylococcus aureus* и *bla*_{TEM-1B} *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* и др.) был составлен перечень участков с теоретически рассчитанной вероятностью их расщепления [6]. Из составленного перечня были выбраны участки, характеризующиеся наибольшей вероятностью расщепления нуклеазой LbCpf1 из *Lachnospiraceae*, и сконструированы соответствующие направляющие РНК. Среднее значение рассчитанной вероятности расщепления последовательностей-мишеней с помощью разработанных РНК составило 96,52%.

В ходе проделанной работы были разработаны направляющие РНК, которые могут быть использованы в системе CRISPR-Cas12 в составе рибонуклеопротеиновых комплексов для выявления генов антибиотикоустойчивости патогенных микроорганизмов:

- 5 шт. для выявления гена антибиотикоустойчивости *bla*_{VIM-2} *P. aeruginosa*;
- 2 шт. для выявления гена антибиотикоустойчивости *mecA* *S. aureus*;
- 6 шт. для выявления гена антибиотикоустойчивости *bla*_{TEM-1B} *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. flexneri* и др.

В качестве модельных матриц использовали плазмидную ДНК pGEM-T, содержащую клонированные фрагменты генов антибиотикоустойчивости:

- pGEM-T-*bla*_{VIM-2}, содержащую в своем составе фрагмент гена антибиотикоустойчивости *bla*_{VIM-2} *P. aeruginosa* размером 411 п.о.;
- pGEM-T-*mecA*-1280, содержащую в своем составе фрагмент гена антибиотикоустойчивости *mecA* *S. aureus* размером 169 п.о.;
- pGEM-T-*mecA*-1412, содержащую в своем составе фрагмент гена антибиотикоустойчивости *mecA* *S. aureus* размером 314 п.о.

• pGEM-T-*bla*_{TEM-1B}, содержащую в своем составе фрагмент гена антибиотикоустойчивости *bla*_{TEM-1B} *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. flexneri* и др. размером 618 п.о.

Предварительную амплификацию участка, соответствующего фрагменту гена антибиотикоустойчивости, проводили с использованием специфических олигонуклеотидов. Для разработки систем CRISPR/Cas с целью выявления генов антибиотикоустойчивости были использованы 1–2 пары специфических олигонуклеотидов для проведения пре-амплификации [3, 4]. Отметим, что эффективность работы систем CRISPR/Cas для выявления генов антибиотикоустойчивости не зависела от длины анализируемых фрагментов.

Для обнаружения генов антибиотикоустойчивости с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas был проведен ряд экспериментов и показано, что комплексы, сформированные на основе LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и со-

ответствующих направляющих РНК, обладают способностью выявлять единичные копии генов антибиотикоустойчивости:

- 1,5 копий гена антибиотикоустойчивости *bla*_{VIM-2} *P. aeruginosa*, внесенных в реакцию предварительной амплификации;
- 1,7 копий гена антибиотикоустойчивости *mecA* *S. aureus*, внесенных в реакцию предварительной амплификации;
- 2,56 копий гена антибиотикоустойчивости *bla*_{TEM-1B} *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. flexneri*, внесенных в реакцию предварительной амплификации.

Также в ходе работ была оценена эффективность выявления единичных копий генов антибиотикоустойчивости, содержащихся в составе модельных матриц, с использованием различных направляющих РНК. Было показано, что рибонуклеопротеиновые комплексы CRISPR/Cas, сформированные на основе LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и направляющих РНК, выявляют единичные копии генов антибиотикоустойчивости с различной эффективностью, и их можно расположить в следующем порядке по уменьшению активности:

sgRNA *bla*_{VIM-2} №207 > sgRNA *bla*_{VIM-2} №93 > sgRNA *bla*_{VIM-2} №366 > sgRNA *bla*_{VIM-2} №285 > sgRNA *bla*_{VIM-2} №95;
crRNA *mecA* №1280 ≈ crRNA *mecA* №1412;
crRNA *bla*_{TEM-1B} №536 ≥ crRNA *bla*_{TEM-1B} №410 > crRNA *bla*_{TEM-1B} №56 ≥ crRNA *bla*_{TEM-1B} №166 > crRNA *bla*_{TEM-1B} №329 ≥ crRNA *bla*_{TEM-1B} №479.

Разработанные направляющие РНК были протестированы на ограниченных панелях клинических образцов:

10 шт., содержащих *P. aeruginosa*, несущую ген антибиотикоустойчивости *bla*_{VIM-2} (ранее подтверждено микробиологическими методами и методом секвенирования следующего поколения);

16 шт., содержащих *S. aureus*, несущую ген антибиотикоустойчивости *mecA* (ранее подтверждено методом секвенирования следующего поколения);

10 шт. (6 шт. *E. coli*, 4 шт. *K. pneumoniae*), содержащих ген антибиотикоустойчивости *bla*_{TEM-1B} (ранее подтверждено методом секвенирования следующего поколения).

В ходе проведенного анализа было показано, что рибонуклеопротеиновые комплексы CRISPR/Cas обладают способностью выявлять гены антибиотикоустойчивости в препаратах ДНК, выделенных из клинических образцов. При этом значение сигнала превышало значение «шума» (неспецифической флуоресценции контрольного образца, не содержащего мишени) в 5 раз в среднем на:

13–14-м цикле (13–14 мин) анализа образцов, содержащих *P. aeruginosa*, несущую ген антибиотикоустойчивости *bla*_{VIM-2};

28–29-м цикле (28–29 мин) анализа образцов, содержащих *S. aureus*, несущую ген антибиотикоустойчивости *mecA*;

19–20-м цикле (19–20 мин) анализа образцов, содержащих ген антибиотикоустойчивости *bla*_{TEM-1B}.

Отметим также, что эффективность выявления генов антибиотикоустойчивости, содержащихся в составе препаратов ДНК, выделенных из клинических образцов, с использованием различных направляющих РНК и LbCpf1 из *Lachnospiraceae* различалась, как и при работе с модельными матрицами.

В литературе имеются упоминания о разработке и получении направляющих РНК для выявления генов антибиотикоустойчивости у бактериальных патогенов с помощью технологии CRISPR/Cas [7, 8]. Например, V.Müller et al. описывают

анализ, основанный на оптическом картировании ДНК отдельных плазмид, несущих гены антибиотикоустойчивости, бактериальных изолятов в наножидкостных каналах, который предоставляет подробную информацию об этих плазмидах, в т.ч. о наличии/отсутствии в них генов антибиотикоустойчивости. Описанный анализ позволяет идентифицировать гены антибиотикоустойчивости с использованием CRISPR/Cas9 и направляющих РНК, специфических к генам антибиотикоустойчивости *bla*_{CTX-M} группы 1, *bla*_{CTX-M} группы 9, *bla*_{NDM} и *bla*_{KPC}. В ходе анализа рибонуклеопротеиновый комплекс CRISPR/Cas9 линейаризует кольцевые плазмиды в районе гена антибиотикоустойчивости, а полученные линейные молекулы ДНК идентифицируются с помощью оптического картирования [7]. Недостатками описанного анализа является необходимость использования дорогостоящего высокотехнологичного оборудования (специализированные нанофлюидные биочипы, инвертированный флуоресцентный микроскоп с увеличением не менее 100×), а также необходимость проведения сложного анализа полученных данных с применением специализированного программного обеспечения. Кроме того, только в перспективе предложенный анализ сможет быть применен к образцам с низкой концентрацией ДНК, так как предложенный способ описывает проведение анализа с образцами, содержащими около 10⁸ копий плазмидных ДНК, несущих гены антибиотикоустойчивости (60 нг ДНК, плазмидной ДНК размером 67 т.п.н. – 220 т.п.н.). В то же время описанные в настоящей работе направляющие РНК позволяют ультрачувствительно выявлять единичные копии генов антибиотикоустойчивости, в т.ч. в составе препаратов ДНК, выделенных из клинических образцов, после предварительной амплификации в составе рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas12.

Заключение

В ходе проделанной работы впервые в России разработаны направляющие РНК, которые могут быть использованы в системе CRISPR/Cas12 в составе рибонуклеопротеиновых комплексов для выявления генов антибиотикоустойчивости патогенных микроорганизмов. Полученные направляющие РНК системы CRISPR/Cas12 способны *in vitro* выявлять целевые последовательности в составе модельных матриц и нуклеиновых кислотах, выделенных из клинических образцов.

После проведения дополнительных исследований, оптимизации и апробации описанные направляющие РНК могут быть использованы для разработки высокочувствительных и высокотехнологичных прототипов диагностических систем нового поколения на основе генетических технологий (направленное редактирование генома) для совершенствования методов диагностики инфекционных заболеваний, в т.ч. для разработки методов выявления антибиотикоустойчивых микроорганизмов.

Подобные разработки направлены на ускорение развития генетических технологий, создают научно-технический задел для реализации широко спектра научных и прикладных проектов, связанных с внедрением в сферу здравоохранения новых медицинских изделий (диагностических систем), средств индикации и идентификации патогенных биологических агентов. Такие диагностические системы

могут обладать более высокой чувствительностью по сравнению с ПЦР. Кроме того, их применение возможно как у постели больного, так и в полевых условиях без использования специализированного высокотехнологического оборудования. Их отличает высокая скорость, простота и потенциально сниженная по сравнению с ПЦР стоимость анализа.

Информация о финансировании

Разработка направляющих РНК для выявления гена антибиотикоустойчивости *bla_{VIM-2}* *P. aeruginosa* выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение No 075-15-2019-1666.

Разработка направляющих РНК для выявления гена антибиотикоустойчивости *mecA* *S. aureus* и гена антибиотикоустойчивости *bla_{VIM-2}* *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. flexneri* выполнена в рамках Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021–2025 гг. (Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011890139-0).

Financial support

The development of guide RNAs for identifying the antibiotic resistance gene *bla_{VIM-2}* of *P. aeruginosa* was carried out with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of a grant in the form of a subsidy for the creation and development of the «World-Class Center for Genomic Research to Ensure Biological Safety and Technological Independence within the Federal Scientific-technical program for the development of genetic technologies», agreement No 075-15-2019-1666.

The development of guide RNAs for identifying the antibiotic resistance gene *mecA* of *S. aureus* and the antibiotic resistance gene *bla_{TEM-1B}* of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. flexneri* was carried out within the framework of the Industry Research Program of Rosпотребнадзор for the period 2021–2025 gg. (Reg. No NIOKTR АААА-А21-121011890139-0).

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. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018 Apr 27;360(6387):436–439. DOI: 10.1126/science.aar6245
2. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438–442. DOI: 10.1126/science.aam9321
3. Тюменцев АИ, Тюменцева МА, Акимкин ВГ. Система CRISPR-Cas для выявления гена антибиотикоустойчивости *bla_{VIM-2}* (металло-бета-лактамаза класс В VIM-2) *P. aeruginosa* в ультранизких концентрациях. Патент РФ №2743861. 2021. Бюл. №7.

4. Тюменцев АИ, Тюменцева МА, Преловская АН, Акимкин ВГ. Система CRISPR-Cas12 для выявления гена антибиотикоустойчивости *mecA* *Staphylococcus aureus* в ультранизких концентрациях. Патент РФ №2782314. 2022. Бюл. №30.
5. Акимкин ВГ, Тюменцев АИ, Тюменцева МА. Система CRISPR-Cas для детекции провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека, интегрированной в геном человека, в ультранизких концентрациях. Патент РФ №2720768. 2019. Бюл. №14.
6. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):827–32. DOI: 10.1038/nbt.2647
7. Müller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Sci Rep*. 2016 Dec 1;6:37938. DOI: 10.1038/srep37938
8. Quan J, Langelier C, Kuchta A, Batson J, Teyssier N, Lyden A, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Res*. 2019 Aug 22;47(14):e83. DOI: 10.1093/nar/gkz418

References

1. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018 Apr 27;360(6387):436–439. DOI: 10.1126/science.aar6245
2. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438–442. DOI: 10.1126/science.aam9321
3. Tyumentsev AI, Tyumentseva MA, Akimkin VG. CRISPR-Cas system for detecting the antibiotic resistance gene *bla_{VIM-2}* (metallo-beta-lactamase class B VIM-2) of *P. aeruginosa* at ultra-low concentrations. Patent RU No 2743861. 2021. Bulletin No 7. (In Russian).
4. Tyumentsev AI, Tyumentseva MA, Prelovskaya AN, Akimkin VG. CRISPR-Cas12 system for detecting the antibiotic resistance gene *mecA* of *Staphylococcus aureus* at ultra-low concentrations. Patent RU No 2782314. 2022. Bulletin No 30. (In Russian).
5. Akimkin VG, Tyumentsev AI, Tyumentseva MA. CRISPR-Cas system for detection of human immunodeficiency virus proviral DNA integrated into the human genome in ultra-low concentrations. Patent RU No 2720768. 2019. Bulletin No 14. (In Russian).
6. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):827–32. DOI: 10.1038/nbt.2647
7. Müller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Sci Rep*. 2016 Dec 1;6:37938. DOI: 10.1038/srep37938
8. Quan J, Langelier C, Kuchta A, Batson J, Teyssier N, Lyden A, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Res*. 2019 Aug 22;47(14):e83. DOI: 10.1093/nar/gkz418

Информация о соавторах:

Тюменцев Александр Игоревич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Преловская Анна Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории геномного редактирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Акимкин Василий Геннадьевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Alexander I. Tyumentsev, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор
Anna N. Prelovskaya, Junior Researcher, Laboratory of Genome Editing, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор

Vasily G. Akimkin, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor, Director of the Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор

Современные подходы к диагностике сочетанных очагов туляремии на территории Алтая

Е.Н.Рождественский, Г.Х.Базарова, Е.С.Полковников, Е.Е.Бжитских, Н.Ю.Красавина, А.А.Киреев

ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск, Республика Алтай, Российская Федерация

Туляремия – это природно-очаговое острое инфекционное заболевание с трансмиссивным путем передачи. Заболеваемость туляремией населения Республики Алтай и Алтайского края в последние годы занимает весьма скромное место, последние два случая заболевания были зарегистрированы в 2010 г. Благополучная эпидемическая ситуация в немалой степени определена высоким уровнем иммунизации населения. С 2015 г. отмечается тенденция к расширению ареала этой инфекции на территории Алтая. С 2016 г. в природных очагах туляремии начал циркулировать штамм, характерный для Средней Азии, – *Francisella tularensis mediasiatica*. В 2017–2023 гг. изолирован 61 штамм туляремийного микроба, из них 51 *F. tularensis mediasiatica* и 10 *F. tularensis holarctica*. Основным источником выделения культур являются эктопаразиты (*Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor silvarum*). Они являются резервуаром и переносчиками туляремии, что соответствует ареалу распространения этих двух видов клещей. Выделенные штаммы подвида *mediasiatica* вирулентны для лабораторных животных (белые мыши), но не вызывают значительной заболеваемости в естественных условиях, т.к. циркулируют в очаге среди клещей. Современным подходом к изучению природных очагов туляремии, где имеет место сочетанная циркуляция возбудителя туляремии двух подвидов – *mediasiatica* и *holarctica*, является разработанная и широко внедренная совместно со специалистами ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболонск) методика определения подвидовой принадлежности на базе станции.

Ключевые слова: природно-очаговая инфекция, возбудитель туляремии, *Francisella tularensis mediasiatica*, *Francisella tularensis holarctica*, вирулентность

Для цитирования: Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Полковников Е.С., Бжитских Е.Е., Красавина Н.Ю., Киреев А.А. Современные подходы к диагностике сочетанных очагов туляремии на территории Алтая. Бактериология. 2023; 8(4): 51–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-51-57

Modern approaches to the diagnosis of combined foci of tularemia in Altai

E.N.Rozhdestvensky, G.Kh.Bazarova, E.S.Polkovnikov, E.E.Bzhitskikh, N.Yu.Krasavina, A.A.Kireev

Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор, Gorno-Altai, Altai Republic, Russian Federation

Tularemia is a naturally occurring acute infectious disease with transmissible transmission. The incidence of tularemia in the population of the Altai Republic and the Altai Territory in recent years has occupied a very modest place; the last two cases of the disease were registered in 2010. The favorable epidemic situation is to a large extent determined by the high level of immunization of the population. Since 2015, there has been a tendency to expand the range of this infection in Altai. Since 2016, a strain characteristic of Central Asia, *Francisella tularensis mediasiatica*, began to circulate in natural foci of tularemia. From 2017–2023 61 strains of the tularemia microbe were isolated, including *F. tularensis mediasiatica* (51) and *F. tularensis holarctica* (10). The main source of crop isolation is ectoparasites (*Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor silvarum*). They are reservoirs and vectors of tularemia, which corresponds to the distribution range of these two types of ticks. The isolated strains *F. mediasiatica* are virulent for laboratory animals (white mice), but do not cause significant morbidity in natural conditions, because circulates in the outbreak among ticks. A modern approach to study natural foci of tularemia with combined circulation of the pathogen *F. tularensis mediasiatica* and *F. tularensis holarctica* (in 2017–2023) is a station-based subspecies methodology developed and widely implemented jointly with specialists from the SCRAMB (Obolensk).

Key words: natural focal infection, causative agent of tularemia, *Francisella tularensis mediasiatica*, *Francisella tularensis holarctica*, virulence

For citation: Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Polkovnikov E.S., Bzhitskikh E.E., Krasavina N.Yu., Kireev A.A. Modern approaches to the diagnosis of combined foci of tularemia in Altai. Bacteriology. 2023; 8(4): 51–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-51-57

Для корреспонденции:

Базарова Галина Хамроевна, кандидат медицинских наук, заведующая бактериологической лабораторией, врач-бактериолог высшей квалификационной категории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Адрес: 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2

Статья поступила 07.08.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Galina Kh. Bazarova, PhD, MD, head of the bacteriological laboratory, bacteriologist of the highest qualification category of the Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Address: 2 Zavodskaya str., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation

The article was received 07.08.2023, accepted for publication 25.12.2023

Туляремия – это природно-очаговое острое инфекционное заболевание с трансмиссивным путем передачи. Источниками возбудителя инфекции являются мелкие млекопитающие, а переносчиками – иксодовые клещи и некоторые двукрылые насекомые [1, 2]. Одно из важнейших стратегических приоритетных направлений деятельности противочумных учреждений – организация и проведение мониторинга туляремии природно-очаговой инфекционной болезни. Внедрение в практику эпизоотологического мониторинга современных информационных и диагностических технологий, в т.ч. направленных на расшифровку генома возбудителя, позволило повысить эффективность профилактических мероприятий, во многом опирающихся на качество прогнозов развития эпидемиологической и эпизоотологической ситуации.

На современном этапе зоонозная природно-очаговая инфекция (туляремия) занимает относительно низкое место в структуре инфекционной заболеваемости на территории России. Значимость возбудителя туляремии, относящегося по классификации CDC к категории А патогенных биологических агентов, определяется различными факторами и особенностями эпидемиологического проявления инфекции [3]. Возбудитель туляремии обладает высокой патогенностью для человека: инокуляция или ингаляция 10–50 бакте-

рий приводит к развитию инфекционного процесса при практически 100%-й восприимчивости организма человека к инфекции [4].

В связи с актуальностью расширения ареала возбудителя туляремии ФКУЗ «Алтайская ПЧС» Роспотребнадзора обеспечивает готовность к проведению диагностических исследований территорий Республики Алтай и Алтайского края. Заболеваемость туляремией населения курируемой территории в последние годы занимает весьма скромное место, последние два случая заболевания были зарегистрированы в 2010 г. Благополучная эпидемическая ситуация в немалой степени определена высоким уровнем иммунизации населения.

Основной задачей, выполняемой Алтайской противочумной станцией на современном этапе, является мониторинг за изменениями эпидемиологической активности природных очагов и структуры заболеваемости. Важным стратегическим элементом наблюдения за эпизоотическим состоянием очагов и прогнозирования эпидемиологического проявления является внедрение новых технологий в процессе многолетних наблюдений и совершенствование диагностических подходов. Правильно выбранная тактика эпизоотологического мониторинга и лабораторного анализа позволяет получить информацию о состоянии активности природного очага и предпринять необходимые меры профилактики.



Рис. 1. Места выделения культур туляремиального микроба в 2015–2023 гг.
Fig. 1. Places of isolation of tularemia microbe cultures in 2015–2023.

Таблица 1. Культуры туляремийного микроба, выделенные в 2015–2023 гг.

Table 1. Cultures of the tularemia microbe isolated in 2015–2023

Адрес / Address	Вид материала / Type of material	Кол-во выделенных культур / Number of isolated cultures	Подвид штамма / Strain subspecies	Зараженность, % / Contamination, %	
2015 г.					
Республика Алтай / Altai Republic	Майминский район / Maiminsky district	<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	10,0
	Чойский район / Choysky district	<i>H. concina</i>	4	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	40,0
		<i>D. silvarum</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	14,3
2016 г.					
Республика Алтай / Altai Republic	Чойский район / Choysky district	<i>H. concina</i>	3	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	20,0
		Вода / Water	1	<i>F. tularensis holarctica</i>	25,0
	Майминский район / Maiminsky district	<i>D. silvarum</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	2,4
Алтайский край / Altai region	Алтайский район / Altai region	Вода / Water	2	<i>F. tularensis holarctica</i>	10,5
		<i>D. silvarum</i>	2	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	22,2
		<i>H. concina</i>	3	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	27,3
	Красногорский район / Krasnogorsk district	Вода / Water	6	<i>F. tularensis holarctica</i>	24,0
	<i>D. reticulatus</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	4,2	
2017 г.					
Республика Алтай / Altai Republic	Майминский район / Maiminsky district	<i>D. silvarum</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	3,2
		<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	6,7
	Чойский район / Choysky district	<i>D. silvarum</i>	2	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	11,2
2018 г.					
Алтайский край / Altai region	Красногорский район / Krasnogorsk district	<i>D. silvarum</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	100,0
	Алтайский район / Altai region	<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	25,0
Республика Алтай / Altai Republic	Чойский район / Choysky district	<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	16,7
2019 год					
Республика Алтай / Altai Republic	Чойский район / Choysky district	<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	11,2
		<i>D. silvarum</i>	4	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	14,8
Алтайский край / Altai region	Алтайский район / Altai region	<i>D. silvarum</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	11,2
2021 г.					
Республика Алтай / Altai Republic	Чойский район / Choysky district	<i>H. concina</i>	2	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	28,5
		<i>D. silvarum</i>	2	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	20,0
Алтайский край / Altai region	Алтайский район / Altai region	<i>D. reticulatus</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	25,0
2022 г.					
Республика Алтай / Altai Republic	Шебалинский район / Shebalinsky district	<i>D. silvarum</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	11,2
	Чойский район / Choysky district	<i>D. silvarum</i>	4	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	36,4
		<i>H. concina</i>	2	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	33,4
	Майминский район / Maiminsky district	Ил / Silt	1	<i>F. tularensis holarctica</i>	1,4
2023 г.					
Республика Алтай / Altai Republic	Чойский район / Choysky district	<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	16,7
		<i>D. silvarum</i>	8	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	47,0
	Шебалинский район / Shebalinsky district	<i>H. concina</i>	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	50,0

Подвидовая принадлежность определена по биохимическим свойствам. / Subspecies have been determined by biochemical properties.

Материалы и методы

Объектами исследований традиционно являются: зверьки, вода, ил, иксодовые клещи, а также комары, слепни и др. Учетом охватывались типичные биотопы предгорной зоны: луго-полевые (суходолы), занимающие основное положение по площади, влажные и околородные. Два последних биотопа наиболее важны для эпизоотологии туляремии в распространенных здесь очагах предгорно-ручьевого типа.

В основу работы положены изолированные штаммы туляремийного микроба и положительные ПЦР-находки, полученные в ходе эпизоотологического мониторинга курируемых территорий на базе Алтайской противочумной станции (2015–2023 гг.).

Результаты и обсуждение

Предгорно-ручьевые природные очаги туляремии Алтай поддерживаются в основном водяной полевкой, но в эпизоотию вовлекаются и другие околородные животные. Переносчиками и длительными хранителями инфекции являются иксодовые клещи. Природные очаги приурочены к ручьям и мелким речкам в предгорьях и низкогорьях Алтай. В некоторых горных системах они занимают не только предгорья, но и глубоко проникают в горно-таежную зону по долинам ручьев и рек [5].

Несмотря на благополучную эпидемическую ситуацию на Алтае, при изменениях в эпизоотическом процессе эти очаги по-прежнему могут служить источниками заражения людей туляремией. Трансформация предгорно-ручьевого природного очага туляремии обуславливает актуальность совершенствования научно-методического обеспечения и внедрения информационных технологий, позволяющих повысить точность и оперативность прогноза развития эпизоотологической ситуации [6, 7].

С 2015 г. отмечается тенденция к расширению ареала этой инфекции на территории Алтай (рис. 1).

С 2015 г. в природных очагах туляремии начал циркулировать штамм, характерный для Средней Азии, – *Francisella tularensis mediasiatica*. С 2015–2023 гг. изолирована 61 культура туляремийного микроба, из них 51 штамм *F. tularensis mediasiatica* и 10 штаммов *F. tularensis holarctica* (табл. 1).

Для решения проблемы подвидовой принадлежности выделенных штаммов традиционно использовались культуральные и биохимические методы, но они требуют работы с живыми культурами, что не позволяет определить подвидовую принадлежность в положительных ПЦР-пробах [8, 9].

Сочетанная циркуляция подвидов туляремийного микроба *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в природных очагах Алтай представляет научно-практический интерес для специалистов, занимающихся санитарно-эпидемиологическим надзором, так как для оценки полного объема эпизоотологической ситуации, помимо эпизоотологического мониторинга наличия возбудителей туляремии на курируемой территории, требуется определение ареала циркуляции возбудителя и по полученным положительным ПЦР-результатам [9].

Идентификация изолированных культур возбудителей туляремии, выделенных на территориях Республики Алтай и Алтайского края, проводится (согласно приказу Роспотребнадзора от 01.12.2017 №1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации патогенных биологических агентов в Российской Федерации») на базе Референс-центра ФБУН ГНЦ ПМБ, а полученные результаты методом ПЦР без выделения культуры не позволяли определить подвидовую принадлежность.

F. tularensis subsp. *mediasiatica* в лабораторных опытах демонстрирует крайне высокую вирулентность и патогенность, а по способности преодолевать поствакцинальный иммунитет даже превосходит *F. tularensis* subsp. *holarctica* [10]. Но в то же время, насколько нам известно, до сих пор в регионах не было зафиксировано ни одного случая туляремии у людей, вызванной среднеазиатским подвидом, что может быть следствием не только недостаточной диагностики, но и сниженной вирулентности этого подвида для человека.

Современным подходом к изучению природных очагов туляремии, где имеет место сочетанная циркуляция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* subsp. *holarctica*, в период 2017–2023 гг. является использование разработанной специалистами ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболонск, и широко внедренной в исследовательскую практику Алтайской противочумной станции методика определения подвидовой принадлежности туляремийного микроба [9, 10].

Возможность определения подвидовой принадлежности штаммов туляремийного микроба позволила с 2017 г. провести анализ пространственной циркуляции и укоренения возбудителя *F. tularensis mediasiatica* (2017–2023 гг. – 51 культура) на территории Алтай, где длительное время циркулировал подвид *F. tularensis holarctica* (10 культур). При проведении эпизоотологического мониторинга методику определения подвидовой принадлежности методом ПЦР использовали как на этапе индикации при исследовании на-

Таблица 2. Объем проведенных исследований за 2015–2023 гг.
 Table 2. Scope of research conducted during 2015–2023

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023 (I полугодие) / (1 st half of the year)
Объекты / Objects	11772	7826	8515	4758	11680	10423	8696	4833	7519
Пробы / Samples	552	617	747	952	1408	987	962	805	416
Пробы ПЦР / PCR samples	336	315	602	952	1408	987	962	805	416
«+»-результаты / «+» results	6	19	4	7	22	1	12	25	16
Выделенные культуры / Selected cultures	6	19	4	3	6	0	5	8	10

Таблица 3. Результаты применения апробированной методики определения подвидовой принадлежности в положительных пробах ПЦР в 2015–2023 гг.

Table 3. Results of applying the tested method for determining subspecies in positive PCR samples in 2015–2023

Вид материала / Type of material	Кол-во ПЦР-результатов «+» / Number of PCR results «+»	Определение подвидовой принадлежности / Determination of subspecies	Кол-во выделенных культур / Number of isolated cultures	Подвид штамма / Strain subspecies
2015 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	6	-	6	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
2016 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	10	-	10	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
Вода / Water	9	-	9	<i>F. tularensis holarctica</i>
2017 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	4	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	4	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
2018 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	3	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	3	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
2019 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	6	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	6	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
2020 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	1	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	0	-
2021 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	6	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	5	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
Вода / Water	2	<i>F. tularensis holarctica</i>	0	-
Ил / Silt	2	<i>F. tularensis holarctica</i>	0	-
Грызуны / Rodents	2	<i>F. tularensis holarctica</i>	0	-
2022 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	18	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	7	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
Ил / Silt	2	<i>F. tularensis holarctica</i>	1	<i>F. tularensis holarctica</i>
Грызуны / Rodents	5	<i>F. tularensis holarctica</i>	0	-
2023 г.				
Эктопаразиты / Ectoparasites	14	<i>F. tularensis mediasiatica</i>	10	<i>F. tularensis mediasiatica</i>
Грызуны / Rodents	2	<i>F. tularensis holarctica</i>	0	-

тивного материала, так и при идентификации выделенных культур возбудителя чумы. Полученные результаты свидетельствовали о высокой информативности при работе с полевым материалом и культурами возбудителя для поиска эпизоотийных участков. Анализ распределения положительных ПЦР-проб (2017–2023 гг. – 87 проб) по секторам позволил скорректировать направление поиска активных участков, повышая вероятность выделения культуры возбудителя. Быстрота получения ответа при использовании ПЦР-метода дала возможность координировать работу зоологических групп, осуществляющих эпизоотологический мониторинг, своевременно и оперативно вносить коррективы в календарно-территориальные планы (рис. 2).

За анализируемый период (2017–2023 (I полугодие) гг.) протестировано 5716 проб из предгорно-ручьевого природного очага туляремии Алтая, где при исследовании коммерческой ПЦР-тест-системой производства «ДНК-Технологии» было получено 87 положительных результатов. Во всех пробах определена подвидовая принадлежность. Из 87 положительных проб, полученных методом ПЦР, изолировано 37 (42,5%) штаммов туляремиального микроба (табл. 2).

Разработанная методика дифференциации подвидов туляремиального микроба позволила провести быструю диффе-

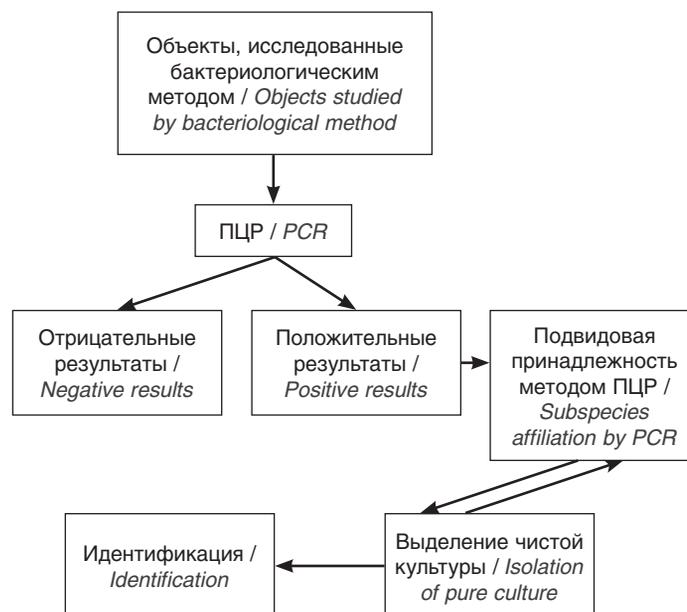


Рис. 2. Схема применения методики определения подвидовой принадлежности в положительных ПЦР-пробах.
 Fig. 2. Scheme of application of the method for determining subspecies in positive PCR samples.

Таблица 4. Выделенные культуры туляремийного микроба по объектам исследований (2015–2023 гг.)
Table 4. Isolated cultures of the tularemia microbe by research objects (2015–2023)

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023 (I полугодие) / (1 st half year)
«+»-результаты методом ПЦР / «+» results by PCR method	6	19	4	7	22	1	12	25	16
Выделенные культуры / Isolated cultures	6	19	4	3	6	0	5	8	10
Эктопаразиты / Ectoparasites	6	10	4	3	6	0	5	7	0
Вода / Water	0	9	0	0	0	0	0	0	0
Ил / Silt	0	0	0	0	0	0	0	1	0

ренциацию *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от subsp. *holarctica* на ранних этапах диагностики (табл. 3).

Несмотря на существенный объем исследований полевого материала и положительных находок ДНК туляремийного микроба за все периоды наблюдений, в 2020 г. возбудитель туляремийного микроба не был обнаружен (табл. 4).

Учитывая необходимость расширения молекулярно-генетического мониторинга возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекционных болезней в 2022 г. при изучении выделенных штаммов туляремии, на станции появилось новое направление для изучения молекулярно-генетической характеристики возбудителей туляремии – секвенирование (полногеномное). В 2022 г. нами впервые проведено молекулярно-генетическое исследование методом полногеномного секвенирования 8 штаммов *F. tularensis mediasiatica*, полученные нуклеотидные последовательности сопоставляли с последовательностями ДНК *F. tularensis*, представленными в международной базе данных NCBI. Просеквенированные штаммы показывают, что этот подвид демонстрирует низкое генетическое разнообразие, и относятся к одной генетической группе Средней Азии.

Полученные результаты при таких расширенных границах природного очага туляремии позволяют более точно определить оседлость *mediasiatica* в Сибири.

Выводы

Разработанный и апробированный метод определения подвидовой принадлежности туляремийного возбудителя при обнаружении фрагмента гена *F. tularensis* показал высокую чувствительность ($1 \cdot 10^3$ м.к./мл) и специфичность (100%) при исследовании выделенных культур туляремийного микроба, а также образцов полевого материала. Полагаем, что разработанный ПЦР-тест в режиме реального времени может быть эффективно использован для мониторинга активности природных очагов туляремии, выявления циркуляции возбудителя на новых эпизоотических участках. Появление технологии высокопроизводительного секвенирования предоставляет возможность для серьезного улучшения инструментов оценки разнообразия возбудителя. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используемый метод полногеномного секвенирования выделенных штаммов возбудителя туляремии в ходе эпизоотологического мониторинга курируемой территории эффективен для изучения генетического разнообразия циркулирующих возбудителей туляремии.

Авторы выражают особую признательность специалистам ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) Бахтеевой И.В., Тимофееву В.С., Мокриевичу А.Н., за оказанную помощь при разработке и внедрении методики определения подвидовой принадлежности возбудителя туляремии, применяемой в настоящее время для прогноза и профилактики активизации эпидемиологического процесса в природных очагах туляремии Алтая.

The authors express special gratitude to the specialists of the Scientific Research Center of for Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk) I.V.Bakhteeva, V.S.Timofeev, A.N.Mokrievich, for their assistance in the development and implementation of a method for determining the subspecies of the tularemia causative agent, which is currently used for prognosis and prevention of intensification of the epidemiological process in natural foci of tularemia in Altai.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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

- Бахтеева ИВ, Кравченко ТБ, Рябко АК, Титарева ГМ, Лев ИО, Мокриевич АН, и др. Особенности β -лактамазной активности среднеазиатского подвида туляремийного микроба. Инфекция и иммунитет. 2018;1:33-42. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42
- Бондаренко ЕИ, Щучинова ЛД, Швалов АН, Щучинов ЛВ. Циркуляция возбудителей туляремии среди клещей в природных очагах Республики Алтай. Сборник трудов X юбилейной международной научно-практической конференции. Том 2. Молекулярная диагностика. 2021;2:16-18.
- Иванов ЛИ, Бондаренко ЕИ, Гуляко ЛФ. Молекулярная диагностика и эпидемиология природно-очаговых и паразитарных инфекций. Сборник трудов X юбилейной международной научно-практической конференции. Том 2. Молекулярная диагностика. 2021;2:7-8.
- Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН. Туляремия в мире. Инфекция и иммунитет. 2021;2:249-264. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380

5. Куликалова ЕС, Мазепа АВ, Холин АВ, Сынгеева АК, Полковников ЕС, Шестаков ВА, и др. Современные эпидемиолого-эпизоотологические особенности природных очагов туляремии на Алтае. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2019;18(3):25-33. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-25-33
6. Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2009;4(102):66-67.
7. Мокриевич АН, Тимофеев ВС, Кудрявцева ТЮ, Уланова ГИ, Карбышева СБ, Миронова РИ, и др. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;1:66-69.
8. Rodionova IV. Differentiation of geographic races of *Francisella tularensis* on the basis of citrulline ureidase activity. Lab Delo. 1970;1:42-3. (In Russian).
9. Бахтеева ИВ, Евсеева ВВ, Титарева ГМ, Миронова РИ, Рождественский ЕН, Базарова ГХ, и др. Использование технологии MELT-MAMA ПЦР для дифференциации подвидов туляремийного и чумного микробов, циркулирующих на территории горного Алтая. Клиническая лабораторная диагностика. 2023;68(8):496-505. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-8-496-505
10. Timofeev V, Bakhteeva I, Mokrievich A, Vakhrameeva G, Gritskova E, Anisimov Y, et al. The First Finding of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* in Krasnoyarsk Territory, Siberia, and an Update of the Subspecies Genetic Diversity. Bacteria. 2022;1:242-250. DOI: 10.3390/bacteria1040018
6. Lapin AA, Pavlov VM, Mokrievich AN, Domotenko LV, Khramov MV. Simple liquid nutrient medium for molecular genetic investigations of *Francisella tularensis*. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2009;4(102):66-67. (In Russian).
7. Mokrievich AN, Timofeev VS, Kudryavtseva TYu, Ulanova GI, Karbysheva SB, Mironova RI, et al. Isolation of central asian subspecies of tularemia agent in the Altai territory. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2013;1:66-69. (In Russian).
8. Rodionova IV. Differentiation of geographic races of *Francisella tularensis* on the basis of citrulline ureidase activity. Lab Delo. 1970;1:42-3. (In Russian).
9. Bakhteeva IV, Evseeva VV, Titareva GM, Mironova RI, Rozhdestvensky EN, Bazarova GH, et al. The use of MELT-MAMA PCR technology to differentiate the subspecies of tularemia and plague microbes circulating in the territory of the Altai mountains. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika). 2023;68(8):496-505. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-8-496-505 (In Russian).
10. Timofeev V, Bakhteeva I, Mokrievich A, Vakhrameeva G, Gritskova E, Anisimov Y, et al. The First Finding of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* in Krasnoyarsk Territory, Siberia, and an Update of the Subspecies Genetic Diversity. Bacteria. 2022;1:242-250. DOI: 10.3390/bacteria1040018

References

1. Bakhteeva IV, Kravchenko TB, Ryabko AK, Titareva GM, Lev IO, Mokrievich AN, et al. Features of beta-lactamase activity in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. Russian Journal of Infection and Immunity. 2018;1:33-42. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42 (In Russian).
2. Bondarenko EI, Shchuchina LD, Shvalov AN, Shchuchinov LV. Tsirkulyatsiya vozбудitelei tulyaremii sredi kleshchei v prirodnykh ochagakh Respubliki Altai. Sbornik trudov X yubileinoi mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Tom 2. Molekulyarnaya diagnostika. 2021;2:16-18. (In Russian).
3. Ivanov LI, Bondarenko EI, Gulyako LF. Molekulyarnaya diagnostika i epidemiologiya prirodno-ochagovykh i parazitarnykh infektsii. Sbornik trudov X yubileinoi mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Tom 2. Molekulyarnaya diagnostika. 2021;2:7-8. (In Russian).
4. Kudryavtseva TYu, Mokrievich AN. Tularemia in the world. Russian Journal of Infection and Immunity. 2021;2:249-264. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380 (In Russian).
5. Kulikalova ES, Mazepa AV, Kholin AV, Syngееva AK, Polkovnikov ES, Shestakov VA, et al. Present-Day Epidemiological-Epizootological Peculiarities of Natural Tularemia Foci in Altai. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2019;18(3):25-33. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-25-33 (In Russian).

Информация о соавторах:

Рождественский Евгений Николаевич, директор ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, врач-бактериолог высшей квалификационной категории

Полковников Евгений Сергеевич, зоолог высшей квалификационной категории зоологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Бжитских Екатерина Евгеньевна, врач-бактериолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Красавина Наталья Юрьевна, лаборант бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Киреев Александр Александрович, медицинский лабораторный техник бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Evgeny N. Rozhdestvensky, director Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор, bacteriologist of the highest qualification category

Evgeny S. Polkovnikov, zoologist of the highest qualification category of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Ekaterina E. Bzhitskikh, bacteriologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Natalya Yu. Krasavina, laboratory assistant of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Alexander A. Kireev, medical laboratory technician of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Влияние низкомолекулярного пептида *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai BKMF-4268D на бактерии рода *Listeria*

А.Ю.Аринбасарова¹, В.Н.Борзенков², Н.К.Фурсова², А.Г.Меденцев¹

¹ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Московская область, Российская Федерация;

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

В настоящей работе представлены данные по изучению антимикробного действия низкомолекулярного пептида, выделенного из клеток штамма *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai BKMF-4268D, против бактерий рода *Listeria*. Установлено, что минимальная подавляющая концентрация пептида, определенная методом диффузии в агар, для всех штаммов составляла 3–5 мг/л. По сравнительным данным, хлорамфеникол оказывал менее выраженное антимикробное воздействие на тест-штаммы бактерий по сравнению с изучаемым пептидом. Данные по исследованию механизма антимикробного действия пептида показали его способность стимулировать дыхательную активность, снижать мембранный потенциал целых клеток листерий и инициировать выход из них АТФ.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, *Trichoderma* cf. *aureoviride*, *Listeria* spp., механизм антимикробного действия

Для цитирования: Аринбасарова А.Ю., Борзенков В.Н., Фурсова Н.К., Меденцев А.Г. Влияние низкомолекулярного пептида *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai BKMF-4268D на бактерии рода *Listeria*. Бактериология. 2023; 8(4): 58–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-58-62

Effect of the low molecular weight peptide isolated from *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai strain BKMF-4268D on *Listeria* spp.

A.Yu.Arinbasarova¹, V.N.Borzenkov², N.K.Fursova², A.G.Medentsev¹

¹Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation;

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

This study presents data on the antimicrobial action of a low-molecular-weight peptide isolated from *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai strain BKMF-4268D, against bacteria of *Listeria* spp. It was found that the minimum inhibitory concentration of the peptide, determined by diffusion into agar, for all strains was 3–5 mg/L. According to comparative data, chloramphenicol had a less pronounced antimicrobial effect on the tested bacteria, compared with the studied peptide. Mechanism of the peptide antimicrobial action was estimated by its ability to stimulate the cell respiratory activity, to reduce the membrane potential of whole *Listeria* cells, and to initiate the release of ATP from the bacterial cells.

Key words: antimicrobial peptides, *Trichoderma* cf. *aureoviride*, *Listeria* spp., mechanism of antimicrobial action

For citation: Arinbasarova A.Yu., Borzenkov V.N., Fursova N.K., Medentsev A.G. Effect of the low molecular weight peptide isolated from *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai strain BKMF-4268D on *Listeria* spp. Bacteriology. 2023; 8(4): 58–62. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-58-62

Для корреспонденции:

Меденцев Александр Григорьевич, доктор биологических наук, руководитель лаборатории адаптации микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина Российской академии наук ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

Адрес: 142290, Пушкино, Московская область, пр-т Науки, 5
Телефон: (4967) 733-962

Статья поступила 09.11.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Aleksander G. Medentsev, PhD, DSc in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms of Microorganisms of the G.K.Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences a Separate Subdivision of the Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences

Address: 5 Nauki ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 733962

The article was received 09.11.2023, accepted for publication 25.12.2023

Антимикробные пептиды (АМП) являются важнейшими компонентами антибактериальной защиты организмов практически всех таксонов живых организмов – бактерий, грибов, растений, амфибий, насекомых, птиц и животных [1–6]. Исследуемый в данной работе низкомолекулярный АМП был получен ранее при культивировании грибного штамма *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D. Пептид с молекулярной массой 1147 kD ([M + H], 1147.8011, C56H99N12O13) состоит из 11 аминокислотных остатков в последовательности: (ацетил-валин)-глицин-лейцин-аминоизобутират-пролин-глицин-лейцин-аминоизобутират-лейцин-пролин-лейцин-ОН [7]. Данный пептид проявлял антимикробную активность против грамположительных бактерий *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus subtilis*, а также аскомицетовых дрожжевых грибов *Yarrowia lipolytica*, относящихся к порядку *Saccharomycetales*. Было показано, что механизм антимикробного действия обусловлен дезэнергизацией цитоплазматической мембраны бактерий или внутренней мембраны митохондрий дрожжей [7].

Бактерии рода *Listeria* широко распространены в природе, часто контаминируют пищевые продукты животного и растительного происхождения, могут быть выделены от животных и людей. В настоящее время к роду *Listeria* отнесены 21 вид и 6 подвидов бактерий [8–10]. Листерии – палочки правильной формы, не образующие споры и капсулы. По Граму они окрашиваются в синий цвет. Живут листерии как в присутствии кислорода, так и без него, поэтому их относят к факультативным анаэробам. В состав клеток бактерий входят соматические и жгутиковые антигены, которые помогают им противостоять иммунитету организма-хозяина. Листерии способны ферментировать глюкозу и образовывать цитохромы, что помогает им получать необходимую для жизни энергию. При неблагоприятных условиях они приобретают L-форму, т.е. частично или полностью лишаются клеточной стенки, но продолжают развиваться. Это обеспечивает бактериям возможность долго находиться в клетках макроорганизма, а также уклоняться от воздействия антибиотиков [11].

Два вида листерий, *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*, являются патогенными, представляющими высокий риск развития опасной инфекции у человека и животных при попадании в макроорганизм с пищей. Определены факторы, позволяющие *L. monocytogenes* вызывать инфекционный процесс. К основным из них относятся эндотоксины, листериолизин и фосфатидилинозитол, которые растворяют мембрану эукариотической клетки, обеспечивая проникновение листерий внутрь нее, повреждают мембраны фаголизосом, защищающих эукариотическую клетку от чужеродных веществ, а также обеспечивают защиту бактерий от действия иммунитета организма-хозяина [10]. У непатогенных видов листерий факторы патогенности не выявлены. Такие бактерии могут быть использованы в качестве модельных микроорганизмов для оценки эффективности антимикробных соединений.

Данная работа посвящена исследованию механизма антимикробного действия низкомолекулярного пептида, выделенного из штамма *T. cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D, на клетки бактерий рода *Listeria*: определению минимальной подавляющей концентрации (МПК) пептида для штаммов

четырёх видов непатогенных листерий методом диффузии в агар; изучению влияния данного антимикробного вещества на дыхательную активность и мембранный потенциал нативных, целых клеток *Listeria* spp.; оценке способности пептида инициировать выход АТФ из клеток листерий.

Материалы и методы

Штаммы

В работе использованы штаммы *L. grayi* МКМ-1 (выделен из мясокостной муки в 2010 г.), *L. innocua* М-4 (выделен от мыши в 2010 г.), *L. seeligeri* АТСС 35967 (выделен из почвы в 2001 г.) и *L. welshimeri* Bel-19 (выделен из мясных полуфабрикатов в 2020 г.), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» (номера доступа соответственно В-7384, В-6643, В-7767 и В-4799).

Антимикробный пептид

Пептид C56H99N12O13 выделен из грибного штамма *T. cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D и охарактеризован ранее как низкомолекулярный пептид с молекулярной массой 1147 kD [7].

Определение антимикробной активности пептида

Чувствительность бактерий к изучаемому пептиду определяли диско-диффузионным методом с использованием питательного агара Muller Hinton (МН, HiMedia, Индия) и стандартных бумажных дисков (НИЦФ, Россия).

Изучение механизма антимикробного действия пептида осуществляли по влиянию пептида на мембранный потенциал целых клеток *Listeria* spp. и по его способности инициировать выход АТФ из нативных клеток листерий. Трансмембранный потенциал измеряли на двухлучевом флуоресцентном спектрофотометре Hitachi 850 (Hitachi, Япония) с помощью потенциал-зависимого флуоресцентного красителя [DiSC3(5)], 3,3'-дипропилтиодикарбонил-цианидиодида (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanineiodide), регистрируя его энергозависимый транспорт [12]. Для определения количества внеклеточного АТФ, выходящего из клеток листерий, бактерии инкубировали с препаратом пептида в концентрации 5, 10 и 15 мг/л, промывали при 5000 g в течение 10 мин и ресуспендировали в дистиллированной воде. Инкубационная смесь содержала 1,4 мл 50 мМ цитрат-фосфатного буфера (pH 6,5) и 0,05–0,1 мл клеточной суспензии. Реакцию начинали добавлением раствора пептида. Через 10-минутные промежутки времени отбирали образцы объемом 0,05 мл, разводили до 2,5 мл в 50 мМ Трис-НСI буфере (pH 7,8, 5 мМ MgSO₄, 0,5 мМ ЭДТА и 0,5 мМ дитиотрейтола). Люминесценцию измеряли на люминометре 1250 (LKB, Швеция) в присутствии люциферина-люциферазы (Serva, Германия) [13]. Для калибровки прибора использовали стандартные растворы АТФ. Все измерения повторяли трижды.

Результаты исследования и их обсуждение

Антимикробная активность пептида

Методом диффузии в агар определена МПК пептида, выделенного из штамма *T. cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D, против тест-штаммов грамположительных бактерий рода *Listeria*, которая составила для всех штаммов 3 мг/л. Ширина зоны задержки роста газона бактериальных куль-

Таблица. Антимикробная активность пептида против штаммов *Listeria* spp.
 Table. Antimicrobial activity of the peptide against *Listeria* spp.

Штамм / Strain	Концентрация пептида, мг/л / Peptide concentration, mg/l					Ширина зоны задержки роста культуры, мм / Width of crop growth inhibition zone, mm
	30	20	10	5	3	
<i>L. grayi</i> MKM-1	21 ± 1	20 ± 1	15 ± 0,5	8 ± 0,3	4 ± 0,1	0
<i>L. innocua</i> M-2	22 ± 1	20 ± 1	18 ± 1	7 ± 0,3	4 ± 0,1	0
<i>L. seeligeri</i> ATCC 35967	23 ± 2	22 ± 1	19 ± 1	17 ± 0,7	6 ± 0,2	0
<i>L. welshimeri</i> Bel-19	23 ± 2	23 ± 2	20 ± 1	12 ± 0,4	6 ± 0,2	0

тур составила при этом 4–6 мм. Повышение концентрации пептида в лунке до 20 и 30 мг/л приводило к увеличению ширины зоны задержки роста до 20–23 мм (таблица). Препарат сравнения – антибиотик хлорамфеникол – в этих же условиях оказывал менее выраженное воздействие на тестируемые бактерии по сравнению с пептидом (данные не приводятся).

Изменения мембранного потенциала клеток листерий под воздействием изучаемого пептида

На основании того, что механизм антимикробного действия пептидов может быть связан как с инактивацией бактерий без существенного повреждения их мембран (например, бактенецинов и аципенсинов) [14, 15], так и с быстрым нарушением структурной целостности бактериальных мембран (например, протегринов) [16], в данной работе использован метод измерения мембранного потенциала клеток листерий под воздействием изучаемого пептида. Показано, что добавление в среду измерения, содержащую флуорофор DiSC3, клеток листерий приводило к уменьшению флуоресценции, что обусловлено энергозависимым транспортом красителя в клетки. Последующее добавление к суспензии клеток пептида приводило к восстановлению флуоресценции до первоначального уровня из-за выхода DiSC3(5) из клеток по причине падения мембранного потенциала. Аналогичное, но более эффективное действие на мембранный потенциал оказывал препарат FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, трифторметоксифенилгидразон), классический разобщитель окислительного фосфорилирования (рис. 1).

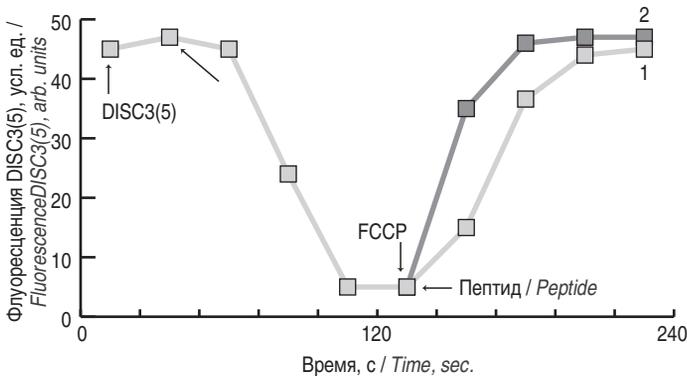


Рис. 1. Влияние изучаемого пептида и разобщителя FCCP на мембранный потенциал клеток *L. grayi* MKM-1 (концентрация 1,2 мг/мл): 1 – пептид, 10 мкг; 2 – FCCP, 5 мкМ; 5 DiSC3.
 Fig. 1. Effect of the studied peptide and FCCP uncoupler on the membrane potential of *L. grayi* MKM-1 cells (concentration 1.2 mg/ml): 1 – peptide, 10 µg; 2 – FCCP, 5 µM; 5 DiSC3.

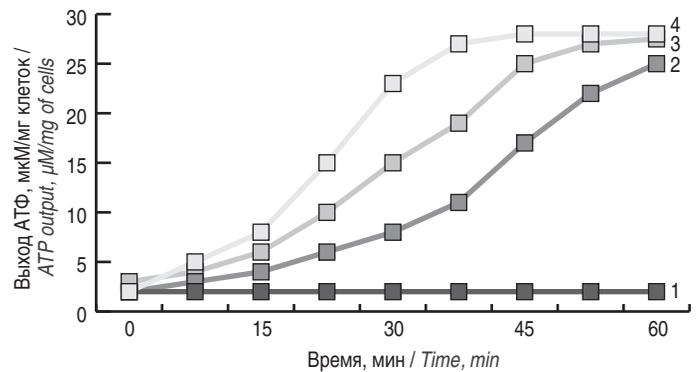


Рис. 2. Изменение внеклеточного уровня АТФ при инкубации клеток штамма *L. grayi* MKM-1 (1,2 мг/мл) в присутствии пептида: 1 – без пептида; 2 – пептид 5 мг/л; 3 – пептид 10 мг/л; 4 – пептид 15 мг/л.

Fig. 2. Changes in the extracellular level of ATP during incubation of cells of the *L. grayi* strain MKM-1 (1.2 mg/ml) in the presence of a peptide: 1 – without peptide; 2 – peptide 5 mg/l; 3 – peptide 10 mg/l; 4 – peptide 15 mg/l.

Индукция пептидом выхода АТФ из клеток листерий

Оценка уровня выхода АТФ из клеток листерий в присутствии изучаемого АМП показала, что пептид активно индуцирует этот процесс. Скорость утечки АТФ зависела от концентрации пептида. В присутствии пептида в концентрации 15 мг/л максимум выхода АТФ наблюдался после 30 мин инкубации; при снижении концентрации пептида до 10 или 5 мг/л процесс выхода АТФ тормозился, а время максимального выхода АТФ увеличивалось до 60 мин и более.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что пептид, выделенный из клеток грибоного штамма *T. cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D, способен образовывать поры в цитоплазматической мембране листерий, через которые происходит выход различных метаболитов, в том числе АТФ (рис. 2).

Изменение скорости потребления кислорода клетками листерий

Экспериментально показано, что внесение в среду инкубирования изучаемого АМП увеличивало скорость потребления кислорода интактными клетками листерий (рис. 3).

На рис. 3 показано, что внесение в среду инкубирования изучаемого АМП (кривая 1) увеличивает скорость потребления кислорода интактными клетками листерий. Аналогичный эффект проявляет FCCP – классический разобщитель окис-

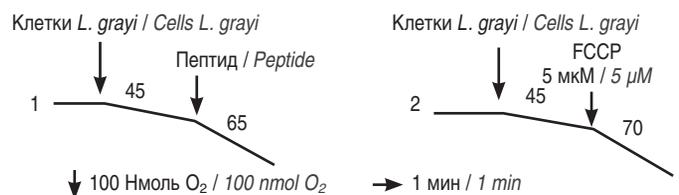


Рис. 3. Влияние изучаемого антимикробного пептида и разобщителя FCCP на потребление кислорода клетками штамма *L. grayi* MKM-1 (1,2 мг/мл). Цифрами на кривых указана активность потребления кислорода (нмоль O₂/мин/мг сухих клеток): 1 – пептид 10 мкг; 2 – FCCP 5 мкМ.

Fig. 3. Effect of the studied antimicrobial peptide and FCCP uncoupler on oxygen consumption by cells of the *L. grayi* strain MKM-1 (1.2 mg/ml). The numbers on the curves indicate the activity of oxygen consumption (nmol O₂/min/mg dry cells): 1 – peptide 10 µg; 2 FCCP 5 µM.

лительного фосфорилирования (кривая 2). Эти данные активно согласуются с описанными выше результатами по снижению мембранного потенциала нативных клеток листерий (рис. 1), что объясняется разобщающим действием молекул изучаемого АМП на окислительное фосфорилирование бактериальной клетки.

Классические механизмы действия АМП рассматриваются как результат их взаимодействия с мембраной бактериальной клетки. К настоящему времени механизм действия многих АМП в значительной степени остается неизученным, хотя предложено несколько моделей, основанных на предположении о решающей роли анионных фосфолипидов и фосфатных групп липополисахаридов в качестве первичной мишени, опознаваемой и акцептирующей АМП у грамотрицательных бактерий и кислых полисахаридов, тейхоевых кислот и липотейхоевых кислот у грамположительных бактерий [17]. Показано, что АМП, взаимодействующие с клеточными мембранами, могут проявлять антимикробную активность на мембранном уровне или внутриклеточно, благодаря проникновению внутрь бактериальных клеток. Взаимодействие АМП с мембраной бактериальной клетки чаще всего приводит к дестабилизации мембраны путем образования переходных нерегулируемых ионных каналов, повышению ее проницаемости и «растворению». В результате повышенной проницаемости питательные вещества и электролиты вытекают из клетки наружу, что приводит к ее гибели.

Представленные в данной работе результаты указывают на то, что механизм антимикробного действия низкомолекулярного пептида, выделенного нами ранее из грибного штамма *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМФ-4268D, обусловлен нарушением проницаемости мембраны бактерий и снижением мембранного потенциала клеток. Необходимо отметить, что механизмы антимикробного действия пептидов могут заметно различаться – одни пептиды инактивируют бактерии без существенного повреждения их мембран, а другие, как показано в данной работе, напротив, вызывают быстрое нарушение структурной целостности бактериальных мембран. Представленные данные показывают, что антимикробная активность изучаемого пептида проявляется несколькими способами, включая способность активировать дыхание, снижать мембранный потенциал целых клеток бактерий и инициировать выход АТФ из нативных клеток листерий.

Таким образом, многофункциональные свойства пептида позволяют предположить невозможность или трудность развития резистентности микроорганизмов к данному препарату при его использовании. Дальнейшие наши исследования будут направлены на характеристику представленного АМП в качестве терапевтического средства для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными бактериальными патогенами.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol.* 2011;162(4):363-374. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.02.005
2. Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016;26(1):14-9. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.017
3. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res.* 2017;96(3):254-260. DOI: 10.1177/0022034516679973
4. Park Y, Hahn KS. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol.* 2005;38(5):507-516. DOI: 10.5483/bmbrep.2005.38.5.507
5. Lee J, Lee DG. Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: membrane disruption and apoptosis. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(6):759-764. DOI: 10.4014/jmb.1411.11058
6. Yasir M, Willcox MDP, Dutta D. Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. *Materials.* 2018;11:E2468. DOI: 10.3390/ma11122468
7. Аринбасарова АЮ, Баскунов БП, Меденцев АГ. Низкомолекулярный антимикробный пептид *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМФ-4268D. *Микробиология.* 2017;86(2):258-260. / Arinbasarova AYU, Baskunov BP, Medentsev AG. A low-molecular mass antimicrobial peptide from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМФ-4268D. *Microbiology.* 2017;86(2):258-260. DOI: 10.7868/S0026365617020057 (In Russian).
8. Carlin CR, Liao J, Weller D, Guo X, Orsi R, Wiedmann M. *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov., and *Listeria rustica* sp. nov. isolated from agricultural water and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021;71:004795. DOI: 10.1099/ijsem.0.004795
9. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3819-3822. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
10. Nguyen BN, Peterson BN, Portnoy DA. Listeriolysin O: A phagosome-specific cytolysin revisited. *Cell Microbiol.* 2019;21(3):e12988. DOI: 10.1111/cmi.12988
11. Grosboillot V, Keller I, Ernst C, Loessner MJ, Schuppler M. Ampicillin treatment of intracellular *Listeria monocytogenes* triggers formation of persistent, drug-resistant L-form cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:869339. DOI: 10.3389/fcimb.2022.869339
12. Te Winkel JD, Gray DA, Seistrup KH, Hamoen LW, Strahl H. Analysis of antimicrobial-triggered membrane depolarization using voltage sensitive dyes. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:29. DOI: 10.3389/fcell.2016.00029
13. Wuly K., Doppen W. Luminometric method. In: Bergmeyer methods of enzymatic analysis (Eds. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M). 1985; 357-364. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
14. Sun C, Gu L, Hussain MA, Chen L, Lin L, Wang H, Pang S, Jiang C, Jiang Z, Hou J. Characterization of the bioactivity and mechanism of bactenecin derivatives against food-pathogens. *Front Microbiol.* 2019;10:2593. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02593
15. Shamova OV, Orlov DS, Balandin SV, Shramova EI, Tsvetkova EV, Panteleev PV, Leonova YF, Tagaev AA, Kokryakov VN, Ovchinnikova TV. Acipensins – novel antimicrobial peptides from leukocytes of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Acta Naturae.* 2014;6(4):99-109.
16. Li J, Chen D, Lin H. Antibiofilm peptides as a promising strategy: comparative research. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(4):1647-1656. DOI: 10.1007/s00253-021-11103-6
17. Cruz GS, Santos ATD, Brito EHS, Rádis-Baptista G. Cell-penetrating antimicrobial peptides with anti-infective activity against intracellular pathogens. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(12):1772. DOI: 10.3390/antibiotics11121772

Информация о соавторах:

Аринбасарова Анна Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

Борзенков Валерий Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Valery N. Borzenkov, MD, PhD, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory of the Molecular Microbiology Department of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Information about co-authors:

Anna Yu. Arinbasarova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms of the G.K.Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms Russian Academy of Sciences a Separate Subdivision of the Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences

НОВОСТИ НАУКИ

Половые различия в симптомах и исходах болезни Лайма

Биологический пол следует включать в качестве важной переменной в клинические исследования для выявления различий в результатах между мужчинами и женщинами.

Чтобы оценить различия по признаку пола у пациентов с болезнью Лайма, у которых был клинически диагностирован диагноз и которые оставались больными в течение шести или более месяцев после лечения антибиотиками, были проанализированы клинические данные от 2170 пациентов из реестра пациентов MyLymeData. Также рассмотрены предыдущие исследования болезни Лайма для распределения пациентов по биологическому полу в зависимости от стадии заболевания, источника данных и определения заболевания, используемого в качестве критериев включения.

Установлено, что женщины сообщили о большем количестве коинфекций, передаваемых клещами, о худших симптомах, более длительных задержках в диагностике, большем количестве ошибочных диагнозов и более серьезных функциональных нарушениях, чем мужчины. Никаких различий в ответе на лечение антибиотиками или побочных эффектах не наблюдалось. Выявлен меньший процент женщин в исследованиях острой болезни Лайма и больший процент женщин в исследованиях хронических заболеваний. В выборках из клинической практики был более высокий процент женщин, чем в рандомизированных контролируемых исследованиях и исследованиях болезни Лайма после лечения.

Вывод: Биологический пол должен быть интегрирован в исследования болезни Лайма как отдельная переменная. Будущие исследования болезни Лайма должны включать данные с разбивкой по полу, чтобы пролить свет на различия, которые могут существовать между мужчинами и женщинами с персистирующим заболеванием.



Johnson L, Shapiro M, Janicki S, Mankoff J, Stricker RB.

Does Biological Sex Matter in Lyme Disease? The Need for Sex-Disaggregated Data in Persistent Illness. Int J Gen Med. 2023 Jun 17;16:2557-2571. DOI: 10.2147/IJGM.S406466

Проблемы диагностики малярии

И.Ю.Щит, П.В.Соловьев, С.Ф.Бикетов

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

В статье рассматриваются проблемы диагностики низкоуровневой малярийной инфекции (субмикроскопической паразитемии) и устойчивости малярийного плазмодия к основному терапевтическому препарату артемизинину. Обсуждаются будущие направления исследований. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе устойчивости к артемизинину, ускорит внедрение научных результатов для решения проблем, связанных с малярийной инфекцией.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, малярия, *Plasmodium*

Для цитирования: Щит И.Ю., Соловьев П.В., Бикетов С.Ф. Проблемы диагностики малярии. Бактериология. 2023; 8(4): 63–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-63-66

Problems of malaria diagnostics

I.Yu.Shchit, P.V.Soloviev, S.F.Biketov

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

The article addresses the issue of diagnosing low-level malaria infection (submicroscopic parasitemia) and the resistance of human malaria parasite species to the main therapeutic agent artemisinin. Future research directions are discussed. Understanding of the molecular mechanisms underlying artemisinin resistance will accelerate implementation of scientific findings to solve problems with malarial infection.

Key words: loop mediated isothermal amplification, LAMP, malaria, *Plasmodium*

For citation: Shchit I.Yu., Soloviev P.V., Biketov S.F. Problems of malaria diagnostics. Bacteriology. 2023; 8(4): 63–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-63-66

Малярия по-прежнему представляет собой серьезную угрозу здоровью людей во всем мире, особенно в эндемичных регионах. Несмотря на появление новых средств химиотерапии и мер борьбы с переносчиками малярии (комарами рода *Anopheles*), уровень заболеваемости и смертности среди людей во всем мире очень высок [1]. В странах, эндемичных по малярии, попытки ликвидировать заболевание столкнулись с рядом трудностей, таких как устойчивость паразитов к лекарственным препаратам, зоонозы и пандемия COVID-19. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения за 2021 г., заболеваемость малярией выросла с 221 млн случаев в 2019 г. до 247 млн случаев в 2020 г., что значительно выше, чем в 2015 г., когда заболеваемость существенно снизилась по сравнению с 2000 г. Более 100 стран, половина из которых находится в Африке, являются неблагоприятными по малярии. Очаги массового заболевания распространены в Юго-Восточной

Азии, Восточном Средиземноморье, Западной части Тихого океана и Америке. Ежегодно на территории России регистрируются завозные случаи малярии из стран ближнего и дальнего зарубежья, где активно действуют очаги малярии. Местные завозные случаи заболевания регистрировались на территориях Москвы, Московской, Ростовской, Самарской, Оренбургской, Нижегородской и Рязанской областей, в Республике Татарстан и Красноярском крае. Условия для формирования местного малярийного очага имеются на территории Пермского края.

Малярия – инфекционное заболевание, вызываемое простейшим паразитом *Plasmodium* spp., которое передается человеку при укусе самки комара *Anopheles*, инфицированной плазмодием. Малярийные комары распространены почти повсеместно, но больше всего в странах с тропическим климатом. Они размножаются в стоячих, хорошо прогреваемых водоемах, где сохраняются благоприятные усло-

Для корреспонденции:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0065

Статья поступила 10.10.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065

The article was received 10.10.2023, accepted for publication 25.12.2023

вия – повышенная влажность и высокая температура воздуха. В России малярийные комары обитают на всей европейской территории страны и в Западной Сибири, кроме полярных и приполярных широт.

Типичными симптомами малярии являются повторяющиеся приступы лихорадки (температура поднимается внезапно с чередованием падений и подъемов), озноб, недомогание, слабость, головная боль и другие гриппоподобные симптомы, боли во всем теле (мышечные, суставные, поясничные), боли в животе, нарушения со стороны нервной и других систем организма [2]. У больного отмечаются сухость во рту, тошнота, рвота, диарея, судороги, анемия. К тяжелым осложнениям заболевания относятся церебральная форма (малярийная кома), инфекционно-токсический шок (малярийный алгид), гемоглобинурийная лихорадка, острый респираторный дистресс-синдром, острый отек легких, нефротический синдром, острая почечная недостаточность, острая печеночная недостаточность, разрыв селезенки. Инфицирование плазмодием может привести к смерти, если не диагностировать возбудитель вовремя и не начать незамедлительное лечение. Особенно подвержены риску младенцы, маленькие дети, беременные женщины и их нерожденные дети, пожилые люди и путешественники из эндемичных по малярии стран [3–5].

Малярию у человека вызывают пять видов *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* и *P. knowlesi*. *P. falciparum* вызывает наиболее опасную форму заболевания, часто протекающую с осложнениями и имеющую высокую смертность. *P. vivax*, *P. ovale*, и *P. malariae* обычно не нарушают функции жизненно важных органов; смертельные случаи редки. Полный спектр клинических проявлений малярии встречается при инфицировании *P. knowlesi*. Его короткий вегетативный цикл репликации может привести к высокой паразитемии и при отсутствии лечения – к тяжелому, потенциально смертельному заболеванию.

Диагностика заболевания проводится с помощью световой микроскопии (толстой капли и тонкого мазка крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе), экспресс-диагностики крови, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и видоспецифических исследований ДНК. В настоящее время золотым стандартом диагностики малярии по-прежнему остается микроскопическое исследование мазков крови для обнаружения эритроцитарных форм паразитов. Однако микроскопия – сравнительно трудоемкий метод, который требует квалифицированного персонала, специального оборудования и реактивов. Диагностику также осуществляют с помощью экспресс-диагностических тестов (БДТ), выявляющих специфические антигены (чаще всего богатый гистицином белок 2 (pHRP-2)). Чувствительность БДТ сравнима с микроскопией, эти тесты более дорогие, но не требуют использования микроскопа и дают результат через 5–15 мин. К недостаткам экспресс-тестов можно отнести растущее число ложноотрицательных результатов, которые возникают из-за делеции в гене pHRP-2 малярийного плазмодия [6]. Кроме того, вполне надежны эти тесты бывают лишь при паразитемии примерно от 2000 паразитов/мкл, быстро теряют свойство во время хранения при температуре >30°C.

В сельской местности и районах, далеких от медицинских учреждений, основными проблемами, которые могут приве-

сти к ошибочному диагнозу, являются отсутствие хороших диагностических средств, неподготовленность микробиологов и большая доля низкоуровневых инфекций (<100 паразитов/мкл крови).

ПЦР способна идентифицировать минимальных количество плазмодиев в крови, ее чувствительность значительно выше, чем у микроскопии, реакция способна выявить субклиническую паразитемию и смешанную инфекцию [7]. Однако стоимость ПЦР-исследования в примерно 10 раз превышает стоимость анализа с помощью экспресс-теста [8]. Дорогостоящее оборудование, необходимость квалифицированного персонала делают метод ПЦР труднодоступным для небольших больниц и медпунктов, а также практически неосуществимым в полевых условиях.

Альтернативой ПЦР служат новые инструменты молекулярной диагностики, включающие методы изотермической амплификации, среди которых наиболее перспективными выглядят рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) и петлевая изотермическая амплификация (LAMP). LAMP представляет собой самоповторяющийся в изотермических условиях синтез ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК-полимеразы со смещением цепи. С появлением этого метода в диагностике малярии появились новые перспективы: достаточная чувствительность для выявления низкоуровневой инфекции, применимость в полевых условиях и в странах с ограниченными ресурсами [9–11].

LAMP-анализ был использован для обнаружения *Plasmodium* spp. в крови с высокой чувствительностью и специфичностью [12–17]. В настоящее время на рынке доступны 2 коммерческих набора для детекции малярии: «LoopAmp malaria (Pan/Pf) detection kit» (Eiken Chemical Company, Япония) и «Illumigene malaria LAMP assay» (Meridian Biosciences, США). Результаты испытаний обоих наборов оказались не столь однозначны. Оба теста показали перекрестные реакции при видоспецифичной идентификации. Так набор «LoopAmp malaria Pf detection kit» в 3,9% (8/205) случаев показал положительную реакцию с образцами *P. vivax*, выявленными с помощью ПЦР, а набор «LoopAmp malaria Pv detection kit» в 7,22% (13/180) случаев показал положительную реакцию с образцами *P. falciparum*, обнаруженными с помощью ПЦР [18]. Поиск альтернативных мишеней для LAMP-анализа остается насущной проблемой.

Существенным препятствием в борьбе с малярией стало появление устойчивых к противомаларийным препаратам плазмодиев. Класс препаратов артемизинина (артесунат, артеметер и дигидроартемизинин) остается наиболее мощным и быстродействующим противомаларийным средством. Артемизинин обычно приводит к снижению паразитемии примерно в 10^3 – 10^4 раза за жизненный цикл плазмодия, составляющий 48 ч. Появление паразитов, резистентных к артемизинину и его производным, привело к неэффективности лечения с помощью этих препаратов. Устойчивость паразитов является результатом генетических изменений, которые приводят к снижению восприимчивости к лекарствам. Чаще всего мутации происходят в гене *kelch13*, который кодирует белок Kelch13, играющий важную роль в реакции паразита на окислительный стресс [19]. Это позволяет мутировавшему паразиту размножаться при воздействии терапевтических доз лекарственного препарата и оставаться в организме хо-

зияна на субмикроскопическом уровне, затрудняя диагностику. Десятилетия предшествующей монотерапии на основе артемизинина привели к появлению устойчивых к этим препаратам паразитов, которые в настоящее время широко распространены по всей материковой части Юго-Восточной Азии, что привело к замедленному уничтожению *P. falciparum* с мутацией Kelch13 по сравнению с плазмодием дикого типа [20–23]. На текущий момент устойчивость к артемизинину наблюдается в Индии [24–25], Южной Америке [26] и на Африканском континенте в Уганде и Руанде [27–29].

Всемирной организацией здравоохранения рекомендована комбинированная терапия на основе артемизинина (АКТ) в качестве средства терапии первой линии. При инфицировании *P. falciparum* малярию лечат артемизинином с мефлохином и примахином в качестве сопутствующего препарата, а в случае *P. vivax* – хлорохином и примахином для уничтожения эритроцитарных форм возбудителей и устранения тканевых форм плазмодия (гипнозоитов), соответственно [30]. Поэтому видоспецифическое определение *Plasmodium* во время диагностики имеет решающее значение для адекватного лечения в районах, где сосуществуют *P. vivax* и *P. falciparum*.

Ситуация осложняется появлением паразитов с множественной лекарственной устойчивостью, что привело к высокой частоте неудач при применении АКТ в западной Камбодже и близлежащих регионах, таких как северо-восточный Таиланд и южный Вьетнам [31–33]. В Индии многолетние исследования изолятов *P. falciparum* со всей страны показали снижение *in vitro* чувствительности к артемизинину уже в 2012 г. [24] и сообщалось о снижении клинической эффективности терапии артезунат-сульфадоксин-пириметамин [34–35]. Артемизинин является наиболее важным противомалярийным препаратом и остается важнейшим инструментом для программ элиминации возбудителя и ликвидации малярии во всем мире. Следует отметить, что помимо чувствительности паразитов к лекарственным препаратам на результаты лечения влияют и другие факторы, такие как приобретенный пациентом иммунитет (особенно у взрослых больных в эндемичных регионах), инфицирующая доза паразита, восприимчивость к лечению, дозировка лекарства, качество препарата и фармакокинетика [36]. Поэтому крайне важно понять, где географически возникает устойчивость, а также различные механизмы устойчивости и взаимодействия паразит–хозяин, связанные со снижением чувствительности к лекарственным средствам. Для снижения устойчивости к артемизинину необходимы клинические исследования и эпидемиологический надзор. Чтобы лучше контролировать малярию в различных регионах, необходимы новые высокочувствительные инструменты для обнаружения низкого уровня плазмодия в крови. В частности, метод LAMP показал лучшую эффективность при выявлении так называемых субмикроскопических и бессимптомных инфекций по сравнению с микроскопической оценкой и тестами экспресс-диагностики. Кроме того, молекулярные методы, основанные на изотермической амплификации, такие как LAMP и RPA, имеют потенциал для диагностики малярии в полевых условиях, поскольку не требуют лабораторного оборудования, а результаты можно обнаружить визуально с помощью различных методов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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. Hanboonkunupakarn B, White NJ. Advances and roadblocks in the treatment of malaria. *Br J Clin Pharmacol*. 2022 Feb;88(2):374–382. DOI: 10.1111/bcp.14474
2. Noreen N, Ullah A, Salman SM, Mabkhot Y, Alsayari A, Badshah SL. New insights into the spread of resistance to artemisinin and its analogues. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021 Dec;27:142–149. DOI: 10.1016/j.jgar.2021.09.001
3. Fried M, Duffy PE. Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Jun 1;7(6):a025551. DOI: 10.1101/cshperspect.a025551
4. Nureye D, Assefa S. Old and recent advances in life cycle, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment of malaria including perspectives in Ethiopia. *Sci. World J*. 2020. e1295381. DOI: 10.1155/2020/1295381
5. Graça L, Abreu IG, Santos AS, Graça L, Dias PF, Santos ML. Descriptive Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) in adults with imported severe *Plasmodium falciparum* malaria: A 10 year-study in a Portuguese tertiary care hospital. *PLoS One*. 2020 Jul 9;15(7):e0235437. DOI: 10.1371/journal.pone.0235437
6. Wilson ML. Malaria rapid diagnostic tests. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun;54(11):1637–41. DOI: 10.1093/cid/cis228
7. Belachew M, Wolde M, Nega D, Gidey B, Negash L, Assefa A, et al. Evaluating performance of multiplex real time PCR for the diagnosis of malaria at elimination targeted low transmission settings of Ethiopia. *Malar J*. 2022 Jan 6;21(1):9. DOI: 10.1186/s12936-021-04029-x
8. Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):2–13. DOI: 10.1093/jac/dku343
9. Han ET. Loop-mediated isothermal amplification test for the molecular diagnosis of malaria. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Mar;13(2):205–18. DOI: 10.1586/erm.12.144
10. Aydin-Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS One*. 2014 Aug 8;9(8):e103905. DOI: 10.1371/journal.pone.0103905
11. Modak SS, Barber CA, Geva E, Abrams WR, Malamud D, Ongagna YS. Rapid Point-of-Care Isothermal Amplification Assay for the Detection of Malaria without Nucleic Acid Purification. *Infect Dis (Auckl)*. 2016 Jan 20;9:1–9. DOI: 10.4137/IDRT.S32162
12. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem*. 2006 Feb;52(2):303–6. DOI: 10.1373/clinchem.2005.057901
13. Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, et al. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Trop*. 2010 Jan;113(1):61–5. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.09.007

14. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, Chiodini PL, Sutherland CJ. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2866-71. DOI: 10.1128/JCM.00355-10
15. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug;45(8):2521-8. DOI: 10.1128/JCM.02117-06
16. Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, Lee SJ, Day NP, Dondorp AM. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Nov;77(5):972-6.
17. Pöschl B, Waneesorn J, Thekiso O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Jul;83(1):56-60. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0630
18. Barazorda KA, Salas CJ, Bishop DK, Lucchi N, Valdivia HO. Comparison of realtime and malachite-green based loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *PLoS ONE.* 2020;15(6):e0234263. DOI: 10.1371/journal.pone.0234263
19. Coppée R, Jeffares DC, Miteva MA, Sabbagh A, Clain J. Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13. *Sci Rep.* 2019 Jul 23;9(1):10675. DOI: 10.1038/s41598-019-47034-6
20. Ariev F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2014 Jan 2;505(7481):50-5. DOI: 10.1038/nature12876
21. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al; Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2014 Jul 31;371(5):411-23. DOI: 10.1056/NEJMoa1314981
22. Kagoro FM, Barnes KI, Marsh K, Ekipirat N, Mercado CEG, Sinha I, et al. Mapping genetic markers of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Asia: a systematic review and spatiotemporal analysis. *Lancet Microbe.* 2022 Mar;3(3):e184-e192. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00249-4
23. Zhu L, van der Pluijm RW, Kucharski M, Nayak S, Tripathi J, White NJ, et al. Artemisinin resistance in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, originates from its initial transcriptional response. *Commun Biol.* 2022 Mar 28;5(1):274. DOI: 10.1038/s42003-022-03215-0
24. Chakrabarti R, White J, Babar PH, Kumar S, Mudeppa DG, Mascarenhas A, et al. Decreased *In Vitro* Artemisinin Sensitivity of *Plasmodium falciparum* across India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Sep 23;63(10):e00101-19. DOI: 10.1128/AAC.00101-19
25. Das S, Manna S, Saha B, Hati AK, Roy S. Novel *pfkelch13* Gene Polymorphism Associates With Artemisinin Resistance in Eastern India. *Clin Infect Dis.* 2019 Sep 13;69(7):1144-1152. DOI: 10.1093/cid/ciy1038
26. Mathieu LC, Singh P, Monteiro WM, Magris M, Cox H, Lazrek Y, et al. *Kelch13* mutations in *Plasmodium falciparum* and risk of spreading in Amazon basin countries. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Oct 11;76(11):2854-2862. DOI: 10.1093/jac/dkab264
27. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana JM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of *in vitro* artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat Med.* 2020 Oct;26(10):1602-1608. DOI: 10.1038/s41591-020-1005-2
28. Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuro OT, Tachibana SI, Yamauchi M, et al. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *N Engl J Med.* 2021 Sep 23;385(13):1163-1171. DOI: 10.1056/NEJMoa2101746
29. Uwimana A, Umulisa N, Venkatesan M, Svigel SS, Zhou Z, Munyaneza T, et al. Association of *Plasmodium falciparum kelch13* R561H genotypes with delayed parasite clearance in Rwanda: an open-label, single-arm, multicentre, therapeutic efficacy study. *Lancet Infect Dis.* 2021 Aug;21(8):1120-1128. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00142-0
30. Ministerio de Salud del Perú. Norma técnica para la atención de la malaria y malaria severa en el Perú. NTS Nro. 054-MINSA/DGSP-V.01, modificada en Febrero 2015. MINSA; 2015. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4373.pdf>. Accessed 17 Mar 2021.
31. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017 Feb;17(2):164-173. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1
32. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017 Feb;17(2):174-183. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30415-7
33. Van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis.* 2019 Sep;19(9):952-961. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30391-3
34. Mishra N, Kaitholia K, Srivastava B, Shah NK, Narayan JP, Dev V, Phookan S, Anvikar AR, Rana R, Bharti RS, Sonal GS, Dhariwal AC, Valecha N. Declining efficacy of artesunate plus sulphadoxine-pyrimethamine in northeastern India. *Malar J.* 2014 Jul 22;13:284. DOI: 10.1186/1475-2875-13-284
35. Das S, Kar A, Manna S, Mandal S, Mandal S, Das S, et al. Artemisinin combination therapy fails even in the absence of *Plasmodium falciparum kelch13* gene polymorphism in Central India. *Sci Rep.* 2021 May 11;11(1):9946. DOI: 10.1038/s41598-021-89295-0
36. World Health Organization (2021). World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization.

Информация о соавторах:

Соловьев Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Pavel V. Soloviev, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, of Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Опасные патогены из группы *Bacillus cereus complex*

Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, К.В.Хлопова, Г.М.Титарева, А.Н.Мокриевич, Е.А.Тюрин, И.А.Дятлов

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

К началу 1990-х гг. было признано выделение некоторых спорообразующих микроорганизмов в отдельную группу *Bacillus cereus complex*, или *Bacillus cereus sensu lato* (в широком смысле). В группу включили три основных вида: *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto* – *B. cereus* в узком смысле), *B. thuringiensis* и *B. anthracis*. Наиболее опасными патогенами из группы *B. cereus complex* являются *B. anthracis* и *B. cereus sensu stricto*. При попадании в организм с инфицированными продуктами *B. anthracis* и *B. cereus s.s.* вызывают у человека и животных кишечную форму сибирской язвы и пищевую токсикоинфекцию. По клиническим проявлениям заболевания дифференцируются с трудом. Сибирская язва быстро завершается смертельным исходом (летальность 50–100%), а токсикоинфекция заканчивается в течение 3–5 суток выздоровлением (летальность ~1%). В дополнение проводят лабораторные исследования. Для лабораторной диагностики используют морфологические, биохимические, серологические и молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция) методы. Однако из-за стремительного развития кишечной формы сибирской язвы получение результатов лабораторных исследований запаздывало и использовалось в основном для постморального диагноза.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, возбудитель, *Bacillus cereus*, инфекция, комплекс, диагностика

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Хлопова К.В., Титарева Г.М., Мокриевич А.Н., Тюрин Е.А., Дятлов И.А. Опасные патогены из группы *Bacillus cereus complex*. Бактериология. 2023; 8(4): 67–75. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-67-75

Dangerous pathogens from the *Bacillus cereus complex* group

L.I.Marinin, N.A.Shishkova, K.V.Khlopova, G.M.Titareva, A.N.Mokrievich, E.A.Tyurin, I.A.Dyatlov

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

By the early 1990-s, it was recognized that some spore-forming microorganisms, were separated into a separate group of *Bacillus cereus complex* or *Bacillus cereus sensu lato* (in the broad sense). The group included three main species – *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto* – *B. cereus* in the narrow sense), *B. thuringiensis* and *B. anthracis*. The most dangerous pathogens from the *B. cereus complex* group are *B. anthracis* and *B. cereus sensu stricto*. When ingested with infected products, *B. anthracis* and *B. cereus s.s.* cause intestinal anthrax and food poisoning in humans and animals. According to the clinical manifestations of the disease, it is difficult to differentiate. Anthrax is quickly fatal (mortality rate 50–100%), and toxicoinfection ends within 3–5 days with recovery (mortality rate about 1%). In addition, laboratory tests are carried out. Morphological, biochemical, serological and molecular genetic (PCR) methods are used for laboratory diagnostics. However, due to the rapid development of the intestinal form of anthrax, obtaining the results of laboratory tests was delayed and was used mainly for postmortem diagnosis.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, causative agent, *Bacillus cereus*, infection, complex, diagnostics

Для цитирования: Marinin L.I., Shishkova N.A., Khlopova K.V., Titareva G.M., Mokrievich A.N., Tyurin E.A., Dyatlov I.A. Dangerous pathogens from the *Bacillus cereus complex* group. Bacteriology. 2023; 8(4): 67–75. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-67-75

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 02.10.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Leonid I. Marinin, MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Particularly Dangerous Infections of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

The article was received 02.10.2023, accepted for publication 25.12.2023

Возбудителями инфекционных заболеваний могут быть микроорганизмы из рода *Bacillus*. В роду *Bacillus*, насчитывающем 263 вида, выделяют группу *Bacillus cereus complex*, или *Bacillus cereus sensu lato* (в широком смысле). Эта группа бацилл представлена тремя основными видами: *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto* – *B. cereus* в узком смысле), *B. thuringiensis* и *B. anthracis*. Это деление было признано к началу 1990-х гг., потому что каждый из видов проявлял различные фенотипические черты. В дополнение к этим трем историческим обозначениям видов включены три менее признанных и исследованных вида: *B. mycoides*, *B. weichenstephanensis* и *B. pseudomycoides* [1].

Наиболее опасным патогеном из группы *B. cereus complex* является *B. anthracis*, вызывающий у человека и парнокопытных животных сибирскую язву (Anthrax, Milzbrand, Charbon, Pustula maligna, Milignant edema). Биологические и молекулярно-генетические свойства возбудителя сибирской язвы изложены в обширной литературе, в т.ч. в наших работах [2, 3]. Основными факторами патогенности являются образование капсулы и синтез токсина. Отличительным признаком, присущим только лишь возбудителю сибирской язвы, является его способность образовывать капсулу в живом макроорганизме и на специальных питательных средах.

Ведущая роль в развитии сибиреязвенной инфекции и ее исходе принадлежит токсину, специфика действия которого проявляется на ранних этапах патологического процесса и который определяет клиническое течение болезни.

Сибиреязвенный экзотоксин относится к бинарным двухкомпонентным токсинам АВ-типа и обладает двумя разными видами биологической активности. В настоящее время выявлено три белковых компонента (фактора) токсина *B. anthracis*, различающихся серологически [3]. Английские исследователи условно назвали их факторами I, II, III, а американские – соответственно факторами отека (EF), защитным или протективным антигеном (РА) и фактором летальности (LF). Каждый из компонентов в отдельности не обладает патогенными свойствами. Для полного проявления биологической активности токсина необходимы все три компонента. Синтез сложного токсина контролируется плазмидой рХ01 с молекулярной массой 110–114 МД. Протективному антигену, являющемуся белком с молекулярной массой 83 кДА (РА83) и не токсичному для лабораторных животных, принадлежит центральная ассоциативно-рецепторная роль в структуре сибиреязвенного экзотоксина. Под воздействием тканевых протеаз от молекулы РА отщепляется фрагмент РА-20, экранирующий сайт ассоциации с LF или EF, и происходит самосборка компонентов в токсические комплексы. Сочетание факторов EF и РА вызывает отек кожи («отечный токсин»), а LF и РА – гибель лабораторных животных («летальный токсин»). Установлено, что LF и EF в сочетании с РА потенцируют сибиреязвенную инфекцию, избирательно угнетая функцию макрофагов. При этом токсин действует на моноциты человека при слабом влиянии на функциональное состояние лимфоцитов. Летальный фактор имеет сложную химическую структуру, является цинк-зависимой металлопротеазой, которая расщепляет МАРК-киназы различных типов клеток, однако только макрофаги погибают под действием этого токсина. Причина

такой избирательности не ясна, но очевидно, что в процесс интоксикации могут быть вовлечены и другие факторы. Были отмечены выраженные изменения физиологических параметров макрофагов после обработки летальным токсином.

Штаммы *B. anthracis*, обладающие факторами патогенности, при попадании в макроорганизм вызывают сибирскую язву. В организм животного и человека возбудитель может попадать различными путями. Человек может заразиться через поврежденную кожу (ссадины, царапины, ранки, расчесы и др.), что бывает наиболее часто. Может произойти заражение через желудочно-кишечный тракт с пищей или водой при наличии повреждения слизистой кишечника. Возбудитель может проникать через дыхательный тракт при вдыхании инфицированной пыли.

В зависимости от способа заражения и путей внедрения возбудителя, патогенности штамма, дозы, иммунного состояния макроорганизма развивается клиническая форма сибиреязвенной инфекции у человека.

И.В.Шестакова [4] на основании анализа публикаций по сибирской язве и вспышки заболевания в 2016 г. на Ямале рекомендует использовать в практическом здравоохранении обновленную классификацию форм сибирской язвы. В зависимости от пути заражения выделены кожная, ингаляционная, желудочно-кишечная и инъекционная формы сибирской язвы. Клиническая классификация сибирской язвы включает внутреннюю (генерализованную) форму сибирской язвы с разновидностями: легочная, желудочно-кишечная (с разновидностями: интестинальная (кишечная) и орофарингеальная).

В данном изложении нас интересует желудочно-кишечная форма сибирской язвы. Во-первых, это связано с возможностью заражения при употреблении в пищу инфицированного мяса, как это произошло в 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе [5]; во-вторых, необходимо для дифференциации от пищевых токсикоинфекций при инфицировании *B. cereus*.

Описаны многочисленны случаи энтерального заражения людей сибирской язвой [3]. Так, после употребления в пищу вареной колбасы заболели и умерли 27 человек [6]. У всех заболевших наблюдались понос с кровью, боли в животе, тяжелое общее состояние, высокая температура тела.

Весьма характерный случай заболевания приводит Л.А.Розеньер [7]: «Домашняя хозяйка, 38 лет, готовящая пельмени для гостей, несколько раз пробовала сырой мясной фарш и на другой день заболела. Началось с болей в животе и общей слабости, невысокой температуры. Участковый врач поставил диагноз острого гастроэнтерита, но общее состояние ухудшилось, усилились боли в кишечнике, стали нарастать явления общей интоксикации и сердечной слабости с потерей сознания; врач дал направление в больницу, но больная скончалась и была доставлена в прозектуру без диагноза».

В июле 1998 г. в Краснодарском крае один из участвовавших в разделке вынужденно забитой коровы заболел на 6-й день после употребления в пищу вареного мяса и ливера, когда у него появились тошнота, многократная рвота и жидкий стул. Развился инфекционно-токсический шок, приведший к летальному исходу.

Имеются сообщения о пероральном заражении и в иностранной литературе. На Филиппинах в 1932 г. произошла вспышка сибирской язвы с проявлениями со стороны кожи и кишечника. Из 250 человек, употреблявших в пищу мясо больного животного, умерли 17 заболевших, из них у 12 отмечались признаки заражения через желудочно-кишечный тракт [8]. В 2004 г. в Уганде (Африка) от сибирской язвы скончались 10 местных жителей, употреблявших в пищу мясо гиппопотамов, погибших от сибирской язвы.

В отдельных странах, например, в США, «кишечная» форма сибирской язвы документально вообще не зарегистрирована и поэтому не известна широкому кругу практических врачей [9]. Некоторые исследователи отмечали, что они никогда не наблюдали в США случаев заражения сибирской язвой человека в результате употребления в пищу контаминированного мяса или молока [10]. Однако в августе 2000 г. из 6 больных, зарегистрированных в штате Миннесота, у двух, употреблявших в пищу мясо павшего бычка, была отмечена гастроинтестинальная форма заболевания [11]. В связи с профилактическим применением антибиотиков заболевание протекало относительно легко (диарея в течение 1–3 дней, боли в животе, повышение температуры тела) и закончилось выздоровлением.

Клиническая картина и течение болезни при этой разновидности сибирской язвы имеет мало характерных признаков, отличается большим разнообразием проявлений на начальных этапах [3, 7, 12, 13] и заканчивается совершенно одинаковой картиной синдрома полиорганной недостаточности (как финального этапа декомпенсации инфекционно-токсического шока).

Ввиду разнообразия клинической картины Г.П.Руднев [14] делит «кишечную» форму сибирской язвы на несколько разновидностей:

- напоминающую непроходимость кишечника, ущемленную грыжу, острый перитонит или тяжелое отравление;
- напоминающую дизентерийные поносы, но в отличие от них сопровождающуюся вздутием живота;
- молниеносные случаи с тяжелыми менингеальными явлениями;
- холероподобные формы;
- гриппозные формы (неопределенного характера) и др.

Такое деление не всегда оправдано, но оно ориентирует врачей в дифференциации сибирской язвы от других заболеваний желудочно-кишечного тракта.

При типичном течении развитие болезни можно разделить на три периода, хотя это не всегда возможно из-за быстрого и тяжелого протекания процесса.

Инкубационный период при данной форме составлял от 1 до 5, иногда 7, суток. Начало болезни острое и выражалось местными симптомами со стороны желудочно-кишечного тракта или общими проявлениями бурно развивающейся интоксикации. Нередко заболевание начиналось недомоганием, слабостью, ознобом, повышением температуры тела до 38–39°C и выше, жесточайшей головной болью, головокружением.

Вторая фаза болезни характеризовалась присоединением абдоминальных признаков. Появлялись острые, разлитые, режущие или тупые боли в животе, преимущественно в нижней части, иногда в области червеобразного отростка

или желчного пузыря, боли в пояснице. Вскоре присоединялись сильная тошнота, кровавая рвота с желчью, чувство напряженности с режущими болями и вздутием живота, а затем понос, вначале кашицеобразный с серозно-слизистыми испражнениями, приобретающими в дальнейшем кровянистый характер. При обследовании таких больных выявлялись сухой и обложенный белым налетом язык, учащенный пульс, аритмичный, малого наполнения, позже нитевидный, артериальное давление низкое; дыхание учащенное, в легких застойные явления с обилием влажных хрипов. Некоторые больные отмечали чувство стеснения в груди, ощущение недостатка воздуха. Кожа и видимые слизистые цианотичны. На коже часто возникали вторичные пустулезные и различные геморрагические высыпания. Живот вздут, при пальпации подложечная область болезненна, мышцы напряжены, печень и селезенка увеличены. В брюшной полости может определяться скопление жидкости – до 3–5 л кислой бледно-желтой или серозно-кровянистой жидкости, содержащей большое количество бацилл [15]. Создавалась картина «острого живота». Возможно развитие пареза кишечника, что напоминало признаки непроходимости кишечника, поэтому известны случаи проведения оперативных вмешательств по поводу «острого живота», аппендицита, непроходимости кишок [16, 17].

Сибирезавенное поражение кишечника иногда приводило к сильному раздражению брюшины, геморрагическому выпоту и, в дальнейшем, к прободению с развитием перитонита. Одновременно с этим появлялись признаки поражения органов грудной клетки: кашель, сильная одышка, выделение мокроты и другие характерные для легочной формы симптомы болезни, т.е. «кишечная» форма как таковая даже с клинической точки зрения существовать перестает. Были ярко выражены явления общей интоксикации. Температура тела повышена, пульс ослаблен, артериальное давление понижено. При виде таких больных в разгаре болезни возникает подозрение о тяжелом общем отравлении с прогрессирующим упадком сердечной деятельности [18].

В третьей фазе болезни, кроме указанных выше признаков, отмечались выраженная бледность и синюшность кожи. Катастрофически нарастала декомпенсация сердечной деятельности. Артериальное давление низкое, пульс нитевидный, дыхание учащенное. Больные беспокойны, возбуждены, бывают бред и эйфория, состояние ступора. Рвотные массы и кал могут содержать примесь крови [3, 19].

Иногда заражение через кишечник вело к быстрому развитию токсико-инфекционного шока, не поддающегося лечению. В качестве примера можно привести одно из последних наблюдений «кишечной формы» сибирской язвы у заболевшего через 20 ч после употребления в пищу шашлыка из инфицированного мяса [6]. При поступлении в больницу состояние крайне тяжелое, резкая общая слабость, повторная рвота, понос, температура тела 37,5°C. Тотальный цианоз. Тахипноэ. Тахикардия. Артериальное давление 60/40 мм рт. ст. Жесткое дыхание. Выраженный метеоризм. Печень на 4 см ниже реберной дуги. Интенсивная терапия была неэффективной. Перед смертью кратковременное возбуждение, клонико-тонические судороги. Из прямой кишки выделение обильного количества темной жидкой крови. Смерть наступила через 22 ч 30 мин после употребления мяса.

Во время вспышки сибирской язвы в 2016 г. на Ямале у одного больного была диагностирована гастроинтестинальная форма заболевания [5, 20], развившаяся после употребления в пищу крови и сырого мяса больных оленей. Клинические проявления характеризовались острым началом с появления слабости, снижения аппетита, рвоты до 5 раз в сутки. В течение 1–2 дней присоединились боли в животе. При поступлении в клинику состояние больного было средней тяжести. Отмечались слабость, вялость, выраженность которых прогрессивно нарастала. Температура тела при поступлении была 36,5°C и в дальнейшем не повышалась. Кожных аффектов и патологии лимфоузлов не выявлено. Живот мягкий, болезненный в мезогастрии. При исследовании крови выявлен выраженный лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево. В течение суток состояние пациента прогрессивно ухудшалось за счет нарастания инфекционно-токсического шока. Проводимая терапия (антибиотикотерапия, иммунотерапия, дезинтоксикационная и патогенетическая терапия) не смогла предотвратить летальный исход, наступивший в течение суток и связанный с развитием вторичного сибирезявленного сепсиса, инфекционно-токсического шока и, как следствие, полиорганной недостаточности.

Температура тела при заражении через кишечник вначале кратковременно субфебрильная, быстро поднималась до 39–40°C и выше, держалась на высоком уровне, а в терминальном периоде могла резко упасть даже ниже нормы (до 35°C), что является плохим прогностическим признаком.

Продолжительность болезни при данной форме сибирской язвы невелика и обычно через 3–4 суток, а иногда и раньше, наступала смерть при явлениях декомпенсированного токсико-инфекционного шока (полиорганная недостаточность). Даже при условии интенсивного лечения удавалось спасти не более половины больных. Считается, что летальность при «кишечной форме» составляет от 50 до 100% [3]. Лечение, как правило, запаздывало. Все это заставляет обратить пристальное внимание на каждый случай кишечного проявления сибирской язвы с целью детального описания и широкой популяризации особенностей проявления этой формы среди практических медицинских работников, так как она совершенно незнакома практическим врачам.

Таким образом, хотя кишечная форма сибирской язвы в обычных условиях явление чрезвычайно редкое, необходимо помнить о ее возможности и учитывать анамнестические сведения об употреблении в пищу инфицированных мясопродуктов.

Во всех случаях при подозрении на заболевание сибирской язвой проводят лабораторные исследования. Для лабораторной диагностики сибирской язвы используют морфологические, биохимические, серологические и молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) методы [3, 21, 22]. Однако из-за стремительного развития кишечной формы сибирской язвы получение результатов лабораторных исследований запаздывало и использовались в основном для постмортального диагноза. В Ямало-Ненецком автономном округе диагноз был подтвержден обнаружением в крови ДНК *B. anthracis* методом ПЦР и выделением культуры возбудителя сибирской язвы из крови, рвотных масс и перитонеальной жидкости [5, 20].

Вторым опасным патогеном из группы *B. cereus complex* является *B. cereus sensu stricto*, способный при определенных условиях вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающих пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции. Впервые этиологическая роль *B. cereus* при пищевых отравлениях была изучена и описана Nauge в 1950 г. Начиная с 1951 г. накопились сообщения об острых желудочно-кишечных заболеваниях у человека, вызываемых *B. cereus* [23, 24]. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), в США ежегодно регистрируется более 60 тыс. случаев заболеваний, вызванных *B. cereus*.

Описываемый микроорганизм был открыт и назван *B. cereus* в 1888 г. Frankland, синонимы: *B. pseudoanthracis* (Wahrlich, 1890/91) и *B. anthracoides* (Kiippi Wood, 1889). В определитель Берджи (1957) этот микроб входит под своим первоначальным названием, которое является общепринятым в современной литературе. По систематическому положению *B. cereus* относятся к роду *Bacillus*, к группе апатогенных аэробных спорообразующих микроорганизмов, т.е. по первичной характеристике были отнесены к сапрофитам. Вследствие этого длительное время оставалась неизученной их роль в патологии человека. Правда, в отдельных сообщениях содержались описания возбудителей отравлений, изолированных из пищи, которых можно было отнести к *B. cereus* [25], но авторы ошибочно относили их к другим видам микробов.

К настоящему времени биологические свойства *B. cereus* достаточно изучены. Прежде всего обращает на себя внимание то, что морфологически эти бактерии очень похожи на *B. anthracis* [26]. Даже считали, что *B. anthracis* является патогенной разновидностью *B. cereus* [27].

Бактерии *B. cereus* относятся к грамположительным факультативно-анаэробным подвижным спорообразующим палочковидным бактериям, широко распространенным в окружающей среде (почве, пресной и морской воде, кишечнике беспозвоночных, на растениях и т.д.) и имеющим фенотипические и генетические (16S рРНК) признаки, сходные с рядом других видов рода *Bacillus*: *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis* [28, 29].

Основные факторы патогенности *B. cereus* связаны с выделением разрушающих ткани реактивных экзоферментов: четырех гемолизин, трех фосфолипаз, индуцирующего рвоту токсина и порообразующих энтеротоксинов (HBL, NHE и токсина К) [30, 31].

Ю.В.Езепчук и А.Р.Битцаев [32] считают, что существует структурное и функциональное сходство между диареогенным летальным токсином (DLT) *B. cereus* и экзотоксином *B. anthracis*. DLT обладает тремя типами биологической активности: диареогенным, летальным и васкулярным. Однако механизмы действия токсина *B. cereus* остаются не до конца изученными. Считается, что патогенность *B. cereus* связана с ее способностью синтезировать и секретировать два экзотоксина. Один из них состоит из трех белковых компонентов, обладает, как выше указывалось, диареогенной, летальной активностью и повышает проницаемость сосудов (диареогенно-летальный токсин). Второй токсин – цереолизин – вызывает цитолитический и летальный эффект и также нарушает проницаемость кровеносных сосудов. Попадая в пище-

вые продукты, патогенные варианты *B. cereus* размножаются в них и продуцируют экзотоксины. Под влиянием протеолитических и других ферментов, выделяемых *B. cereus*, в продуктах накапливаются различные ядовитые вещества (птомаины). Все это вместе взятое и приводит к развитию пищевого отравления.

Пищевую токсикоинфекцию с преобладающим диарейным синдромом вызывает употребление в пищу недостаточно термически обработанных мясных и рыбных блюд, невымытых овощей, непастеризованного молока, в то время как контаминированный *B. cereus* (10^5 – 10^8 КОЕ/г) рис и другие крахмалсодержащие продукты, а также сыр вызывают гастроэнтерит с ведущим рвотным синдромом [33].

Заболевание характеризуется коротким инкубационным периодом – несколько часов, редко более суток. Продолжительность инкубационного периода может зависеть от многих факторов (дозы попавшего возбудителя, степени его патогенности, сопротивляемости макроорганизма и др.). Болезнь возникает внезапно, сопровождается рвотой и острой диареей.

Симптомы заболевания в большинстве случаев исчезали через 11–14 ч, и в пределах 24–48 ч больные полностью выздоравливали [34]. Однако наблюдались случаи тяжелого течения заболевания с летальным исходом. Летальность составляла <1%. Смерть наступала у лиц с ослабленным здоровьем, главным образом у стариков и детей [35].

Пищевое отравление, вызываемое *B. cereus*, имеет как общеклинические проявления (тошноту и абдоминальные боли), так и превалирующие симптомы, на основании которых выделяют две формы заболеваний: диарейную и токсикозоподобную (рвотную). Диарейная форма развивается при попадании в организм больших количеств *B. cereus* – $>10^6$ микробных клеток, которые продуцируют энтеротоксин диарейного типа. Клиническая картина развивается через 24 ч после употребления инфицированного продукта. Диарея частая, водянистая, с большим количеством слизи наблюдается в течение 6–15 ч без присоединения рвоты. Температура тела, как правило, не повышается.

Токсикозоподобная (рвотная) форма пищевого отравления имеет чрезвычайно короткий инкубационный период (от 30 мин до 6 ч) и характеризуется тошнотой и рвотой, длящейся до 24 ч. В «виновном» продукте и рвотных массах регистрируется специфический термостабильный токсин.

Диагностика пищевого отравления, вызванного *B. cereus*, основана на изоляции и идентификации выделенных штаммов.

Для подтверждения наличия *B. cereus* и/или ее токсинов в пищевых продуктах и клинических образцах используются морфологические, биохимические, серологические (иммуноферментный анализ) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы [24, 36, 37].

В настоящее время определение бактерий *B. cereus* производится по Межгосударственному стандарту «Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий *B. cereus*». Термин «презумптивный» указывает на то, что данный метод не предусматривает дифференциацию *B. cereus* от других видов *Bacillus*, в т.ч. *B. anthracis*.

Для обнаружения *B. cereus* и/или его токсинов в пищевых продуктах и клинических образцах чаще всего используют

метод времяпролетной масспектрометрии на масспектрометре MALDI-TOF. Так же используют ELISA (обнаружение бактериальных токсинов компонентов NheA и энтеротоксин Hbl) и RPLA (обратная пассивная агглютинация латекса). Аккредитованных тест-систем на основе ПЦР не существует. Описаны методики оценки токсического эффекта на культурах клеток или анализ подвижности сперматозоидов хряка, но данные методы не нашли применения в практическом здравоохранении. Также ведутся работы по подбору биологической модели для исследования токсического эффекта *B. cereus* [24, 36].

Для выделения культуры *B. cereus* используют плотные и жидкие питательные среды [23, 38–40]. Посевы термостатируют при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч. Отбирают колонии, характерные для *B. cereus*, и изучают морфологические и биохимические особенности микроорганизмов.

В мазках *B. cereus* имеет вид крупных грамположительных палочек размером $1,0$ – $1,2 \times 3,0$ – $5,0$ мкм со слегка закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакетобразных скоплений, реже – отдельно друг от друга. При дальнейшем культивировании в мазках наблюдаются центрально и субтерминально расположенные споры.

Одним из важных тестов является определение подвижности микробных клеток. Клетки *B. cereus* подвижны, однако могут встречаться штаммы со слабо выраженной подвижностью.

При дифференциации *B. cereus* используют ряд биохимических тестов. От других сапрофитных споровых аэробов *B. cereus* отличается по ряду свойств: образованию лецитиназы, ацетилметилкарбинола, утилизации цитратных солей, ферментации маннита и рост в анаэробных условиях на среде с глюкозой.

В результате анализа литературных данных и результатов собственных исследований Н.А.Феоктистовой с соавт. [41, 42] была сформирована схема выделения и идентификации бактерий *B. cereus*, основанная на определении 30 биохимических свойств и использовании специфических цереусных бактериофагов Вс-4 и Вс-8 УГСХА.

Однако нестабильность ферментативных реакций *B. cereus* затрудняет межвидовую дифференциацию бактерий группы рода *Bacillus* и, кроме того, требует серьезных временных затрат. В связи с этим вопрос о разработке ускоренного достоверного метода идентификации *B. cereus* все еще остается актуальным.

Ключевое значение для определения патогенности штаммов имеет идентификация генов токсинов, которые определяют патогенный потенциал. Для синдрома диареи были описаны три энтеротоксина: цитотоксин CytK [43], негемолитический энтеротоксин Nhe [44] и гемолизин Hbl [45].

Методы, основанные на ПЦР, были разработаны для поиска генов хромосомных токсинов Nhe, Hbl и CytK, а также кластера гена рвотного токсина *ces*. Было показано, что гены *Nhe* находятся у всех микроорганизмов группы *B. cereus*, включая *B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis* и даже *B. anthracis*.

Продукцию цереулидов можно определить с помощью геноспецифической ПЦР на ген *ces* [46]. Исследования показали, что ген *ces* может быть не только у рвотных штаммов *B. cereus*, но и у двух изолятов *B. weihenstephanensis* [47]. Синтез цереулида кодируется в локусе гена *ces*, кото-

рый расположен на мегаплазмиде, называемой pCER270 (или pCERE01). Эта плаزمида родственна плазмиде токсина *B. anthracis* pX01 [46].

Н.А.Феокистова с соавт. [48] в результате проведенных исследований подобрали специфические праймеры на основе гена *16S* рРНК для бактерий группы *B. cereus complex*. Постановка ПЦР с детекцией в режиме реального времени с применением праймеров, специфичных для представителей группы *B. cereus complex*, рекомендуется как метод первичной идентификации вышеназванных бактерий и способ индикации в объектах ветеринарно-санитарного надзора. Чувствительность метода составляет 10^2 – 10^3 мкг.

Следует, однако, подчеркнуть, что положительные результаты ПЦР не являются подтверждением наличия полного и функционального гена, но они обеспечивают надежную индикацию присутствия микроорганизмов.

Заключение

Наиболее опасными патогенами из группы *B. cereus complex* является *B. anthracis*, вызывающая у человека и парнокопытных животных сибирскую язву, а также *B. cereus sensu stricto*, вызывающая у человека и животных широкий спектр заболеваний, включающих пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции.

При выяснении этиологии пищевых отравлений большое значение имеет дифференциация *B. cereus* и *B. anthracis*, так как кишечная форма сибирской язвы по клиническим признакам может быть принята за пищевое отравление. *B. anthracis* отличается от *B. cereus* рядом характерных признаков: рост в бульоне и желатине, способность образовывать капсулу в организме и на специальных питательных средах, чувствительность к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья») [22]. Кроме того, имеются различия по чувствительности к специфическим бактериофагам и в реакции преципитации.

Для дифференциации *B. cereus* и *B. anthracis* используется тест на фосфатазу [2, 21]. На дифференциально-диагностической среде для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба с фенолфталеинфосфатом натрия бактерии *B. cereus* растут в виде распластанных матовых колоний. При взаимодействии с парами аммиака колонии *B. cereus* и других спорообразующих сапрофитов приобретают розовый или красный цвет, колонии же *B. anthracis* не изменяют своего цвета либо слабо розовеют (рис. 1).

Для выделения и дифференциации *B. cereus* и *B. anthracis* можно использовать разработанную в ГНЦ ПМБ питатель-

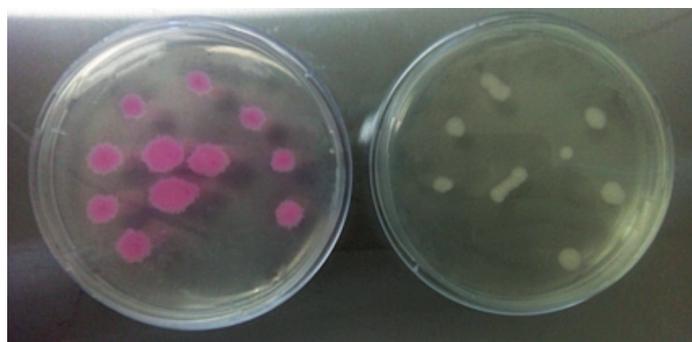


Рис. 1. Фосфатазная активность у *B. cereus* и *B. anthracis*.
Fig. 1. Phosphatase activity in *B. cereus* and *B. anthracis*.

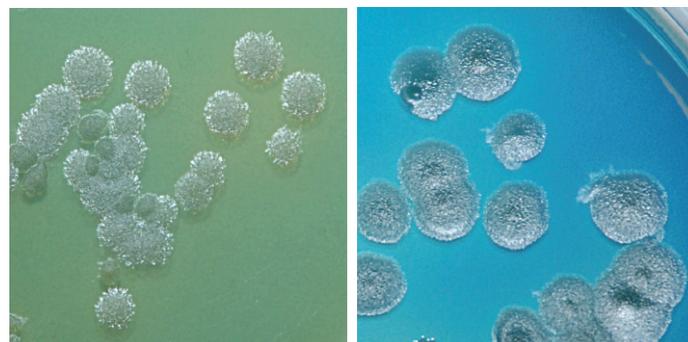


Рис. 2. Рост колоний *B. anthracis* (слева) и *B. cereus* (справа) на диагностической питательной среде.

Fig. 2. Growth of *B. anthracis* and *B. cereus* colonies on diagnostic nutrient medium.

ную среду, содержащую D-сорбит, бромтимоловый синий и полимиксин [2].

Выращивание на среде с D-сорбитом позволяет провести дифференциацию колоний близкородственных сапрофитов от штаммов *B. anthracis* по цвету среды и по морфологии. На рис. 2 представлен характер роста возбудителя сибирской язвы и *B. cereus* на питательной среде с D-сорбитом.

B. cereus защелачивает среду с D-сорбитом, колонии и питательная среда окрашиваются в синий цвет. Сибиреязвенные штаммы, утилизируя D-сорбит, закисляют среду, в результате чего колонии и питательная среда приобретают желто-зеленое или зеленое окрашивание.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств микроорганизмов, выделенных из колоний, обнаружены подвижные, крупные грамположительные палочки со спорами, продуцирующие лецитиназу и не ферментирующие маннит, нитратредуцирующие, способные образовывать ацетилметилкарбинол, ферментировать в анаэробных условиях глюкозу, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к *B. cereus*.

Описанные выше тесты обычно достаточны для того, чтобы отличить типичные штаммы *B. cereus* от других представителей группы *Bacillus*. Однако результаты по атипичным штаммам *B. cereus* довольно разнообразны, и может потребоваться дальнейшее тестирование для идентификации изолятов. В качестве дополнительной дифференциации изолятов *B. cereus* в сомнительных случаях возможна постановка ПЦР с видоспецифическими праймерами, например, на ген *gyrB*. Ген *gyrB* кодирует белок субъединицы В ДНК-гиразы (топоизомераза типа II), который необходим для репликации ДНК [49]. Ген используется в филогенетическом и таксономическом анализе, поскольку он присутствует у различных видов бактерий. Кроме того, ген обладает более высокой специфичностью, чем *16S* рРНК, благодаря более быстрой эволюции, которая способствует меньшему проценту сходства генов даже среди близкородственных видов [50] и, следовательно, подходит для идентификации видов бактерий.

Кроме инфекций, связанных с пищевым отравлением, *B. cereus* была выявлена при множестве других клинических состояний. Сообщалось о молниеносном сепсисе, менингите и абсцессах головного мозга, эндофтальмите, эндокардите, остеомиелите, кожной инфекции по типу газовой гангрены и т.д. [51]. В последние годы появились сведения о пневмони-

ях, вызываемых *B. cereus*. Так, A.R.Hoffmaster et al. [52] сообщают о выделении из слюны и крови больного пневмонией человека штамма *B. cereus* G9241, имеющего плазмиду pBCX01, гомология которой с плазмидой pX01 *B. anthracis* составила 99,6%. При проведении диагностических тестов у полученного изолята было обнаружено сходство с сибиреязвенным микробом. По вирулентности для белых мышей штамм G9241 находился на уровне штамма *B. anthracis* Sterne. Течение заболевания у больного было сходным с заболеванием у людей, подвергшихся аэрогенному заражению возбудителем сибирской язвы. Наблюдались случаи пневмонии с летальными исходами, при которых выделяли штаммы *B. cereus*, продуцирующие токсин, подобный сибиреязвенному [28, 29, 49, 53].

Приведенные сведения указывают на то, что близкородственные спорообразующие сапрофиты могут быть потенциальными возбудителями серьезных инфекций [54].

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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

- Okinaka RT, Keim P. The Phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *Microbiol Spectr*. 2016 Feb;4(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0012-2012
- Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. М.: «Гигиена», 2009. / Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, et al. Metody izucheniya biologicheskikh svoystv vozbuditelya sibirskoi yazvy. M.: «Gigiena», 2009. (In Russian).
- Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Фирстова ВВ. Сибирская язва вчера и сегодня. М.: Издательство «Династия», 2021. / Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Firstova VV. Sibirskaya yazva vchera i segodnya. M.: Dinasty, 2021. (In Russian).
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Ежлова ЕБ, и др. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 г. Ижевск: ООО «Принт-2», 2017. / Popova AYU, Demina YuV, Ezhlova EB, i dr. Opyt likvidatsii vspyshki sibirskoi yazvy na Yamale v 2016 g. Izhevsk: ООО «Print-2», 2017. (In Russian).
- Шестакова ИВ. Сибирская язва ошибок не прощает: оценка информации после вспышки на Ямале летом 2016 года. Журнал инфектологии. 2016;8(3):5-27. / Shestakova IV. Anthrax does not forgive mistakes: the information assessment following the yamal peninsula outbreak in the summer of 2016. *Journal Infectology*. 2016;8(3):5-27. (In Russian).
- Бондарев ЛС, Туйнов ВА, Голоденко МА, Туйнов СВ. Сибирская язва в Донецкой области. Эпидемиология и инфекционные болезни. 1998;2:16-18. / Bondarev LS, Tuinov VA, Golodenko MA, Tuinov SV. Sibirskaya yazva v Donetskoi oblasti. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 1998;2:16-18. (In Russian).
- Розеньер ЛА. Сибирская язва у человека. Кишинев, 1948. / Rozener LA. Sibirskaya yazva u cheloveka. Kishinev, 1948. (In Russian).
- Farinas EC. The last anthrax outbreak in La Union Luzon. *Philippine Islands. Symp. Anthrax in Man. Hospital of the University of Pennsylvania. Philadelphia*. 1954; 13-20.
- Brachman PS, Kaufman AF, Dalldorf FG. Industrial inhalation Anthrax. *Bacteriol Rev*. 1966 Sep;30(3):646-59. DOI: 10.1128/br.30.3.646-659.1966
- Steele JH, Helvig RJ. Anthrax in the United States. *Public Health Rep (1896)*. 1953 Jun;68(6):616-23.
- Kobuch WE, Davis J, Fleischer K, Turnbull PC. A clinical and epidemiological study of 621 patients with anthrax in Western Zimbabwe. *Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England. Salisbury Med. Bull. Special Supplement*. 1990 Apr;68:33-38.
- Лобзин ЮВ, Волжанин ВМ, Захаренко СМ. Сибирская язва. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002;4(2):104-127. / Lobzin YuV, Volzhanin VM, Zakharenko SM. Sibirskaya yazva. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2002;4(2):104-127. (In Russian).
- Маринин ЛИ, Онищенко ГГ, Кравченко ТБ. Сибирская язва человека. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА», 2008. / Marinin LI, Onishchenko GG, Kravchenko TB. Sibirskaya yazva cheloveka. M.: ZAO MP «GIGIENA», 2008. (In Russian).
- Руднев ГП. Сибирская язва человека (Патогенез. Клиника. Дифференциальный диагноз. Лечение). В кн.: Антракс (Вопросы иммунологии, клиники и лабораторной диагностики). 1964: 22-28. / Rudnev GP. Sibirskaya yazva cheloveka (Patogenez. Klinika. Differentsial'nyi diaznoz. Lechenie). V kn.: Antraks (Voprosy immunologii, kliniki i laboratornoi diagnostiki). 1964: 22-28. (In Russian).
- Dutz W, Saidi F, Kohout E. Gastric anthrax with massive ascites. *Gut*. 1970 Apr;11(4):352-4. DOI: 10.1136/gut.11.4.352
- Глазунова МГ. Клиническая характеристика сибирской язвы по данным клиники инфекционных болезней. Советское здравоохранение Киргизии. 1986;2:36-39. / Glazunova MG. Klinicheskaya kharakteristika sibirskoi yazvy po dannym kliniki infektsionnykh boleznei. *Sovetskoe zdравookhranenie Kirgizii*. 1986;2:36-39. (In Russian).
- Журин ПН. Диагностика и эпидемиология двух случаев кишечной формы сибирской язвы в одной семье. Микробиология. 1969;4. / Zhurin PN. Diagnostika i epidemiologiya dvukh sluchaev kishhechnoi formy sibirskoi yazvy v odnoi sem'e. *Mikrobiologiya*. 1969;4. (In Russian).
- Jena GP. Intestinal anthrax in man: a case report. *Cent Afr J Med*. 1980 Dec;26(12):253-4.
- Адилов ДА, Бругинская ГВ, Туляганов КС. К клинике и диагностике антракса. В сб.: Вопросы иммунопрофилактики и иммунодиагностики. 1970: 235-241. / Adilov DA, Broginskaya GV, Tulyaganov KS. K klinike i diagnostike antraksa. V sb.: Voprosy immunoprofilaktiki i immunodiagnostiki. 1970: 235-241. (In Russian).
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Плоскирева АА, Горячева ЛГ. Поражение желудочно-кишечного тракта при сибирской язве. Лечащий врач. 2017;2:29-31. / Popova AYU, Demina YuV, Ploskireva AA, Goryacheva LG. Porazhenie gastrointestinal'nogo trakta pri sibirskoi yazve. *Lechashchii vrach*. 2017;2:29-31. (In Russian).
- Груз ЕВ. Изучение и рационализация некоторых лабораторных методов индикации и идентификации *Bac. anthracis*. Автореф. дис... канд. мед. наук. Одесса, 1965. / Gruz EV. Izuchenie i ratsionalizatsiya nekotorykh laboratornykh metodov indikatsii i identifikatsii *Bac. anthracis*. Diss. Odessa, 1965. (In Russian).
- Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания №4.2.2413-2008. / Laboratornaya diagnostika i obnaruzhenie vozbuditelya sibirskoi yazvy. *Metodicheskie ukazaniya №4.2.2413-2008*. (In Russian).
- Ахундова КА. Значение *B. cereus* в патологии человека. Микробиология. 1967;10:129-132. / Akhundova KA. Znachenie *B. cereus* v patologii cheloveka. *Mikrobiologiya*. 1967;10:129-132. (In Russian).

24. Маринин ЛИ, Шишкова НА. Возбудители инфекционных заболеваний из рода *Bacillus*. В кн.: Микробиологический контроль качества пищевой продукции. М.: Издательство «Династия». 2020; 285-307. / Marinin LI, Shishkova NA. Vozbuditeli infektsionnykh zabolevaniy iz roda *Bacillus*. V kn.: Mikrobiologicheskii kontrol' kachestva pishchevoi produktsii. Moscow: Dinasty. 2020; 285-307. (In Russian).
25. Bodnar S. Ueber durch *Bacillus cereus* verursachte Lebensmittel vergiftungen. Ges. Hyg. Grenzgeb. 1962;8:368-370.
26. Калдыркаев АИ, Феоктистова НА, Мустафин АХ, Васильев ДА. Методика выделения фагов бактерий вида *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, перспективы их применения. Естественные и технические науки. 2011;2(52):83-84. / Kaldyrkaev AI, Feoktistova NA, Mustafin AKh, Vasil'ev DA. Metodika vydeleniya fagov bakterii vida *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*, perspektivy ikh primeneniya. Estestvennye i tekhnicheskije nauki. 2011;2(52):83-84. (In Russian).
27. Priest FG, Barker M, Baillie LW, Holmes EC, Maiden MC. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. J Bacteriol. 2004 Dec;186(23):7959-70. DOI: 10.1128/JB.186.23.7959-7970.2004
28. Han CS, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Brown N, et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2006 May;188(9):3382-90. Erratum in: J Bacteriol. 2006 Nov;188(21):7711. Brown, Nancy [added]; Green, Lance D [added]. DOI: 10.1128/JB.188.9.3382-3390.2006
29. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. FEMS Microbiol Rev. 2005 Apr;29(2):303-29. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.005
30. Езепчук ЮВ. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина, 1985. / Ezerchuk YuV. Patogennost' kak funktsiya biomolekul. M.: Meditsina, 1985. (In Russian).
31. Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Ceragioli M, Beecher DJ, Senesi S, et al. Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 2007 Jun;73(12):4089-93. DOI: 10.1128/AEM.02345-06
32. Езепчук ЮВ, Битцаев АР. Структурное сходство токсинов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*. М., 1990. / Ezerchuk YuV, Bittsaev AR. Strukturnoe skhodstvo toksinov *Bacillus cereus* i *Bacillus anthracis*. M., 1990. (In Russian).
33. Wijnands LM, Dufrenne JB, Zwietering MH, van Leusden FM. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. Int J Food Microbiol. 2006 Nov 1;112(2):120-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.015
34. Wildfuhr G. Medizinische Mikrobiologie, Immunologic und Epidemiologic. Leipzig, 1959.
35. Temper K. Exitus letalis nach Lebensmittel vergiftung durch *Bacillus cereus*. Z. Gesamte Hyg. Grenzgeb. 1963;9:481-490.
36. Tallent SM, Kotewicz KM, Strain EA, Bennett RW. Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. J AOAC Int. 2012 Mar-Apr;95(2):446-51. DOI: 10.5740/jaoacint.11-251
37. Межгосударственный стандарт Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий *Bacillus cereus*. Метод подсчета колоний при температуре 30°C. ГОСТ ISO 21871-2013. / Mezghosudarstvennyi standart Mikrobiologiya pishchevykh produktov i kormov dlya zhivotnykh. Gorizonta'nyi metod podsчета prezumptivnykh bakterii *Bacillus cereus*. Metod podsчета kolonii pri temperature 30°C. GOST ISO 21871-2013. (In Russian).
38. Gordon R. The genus *Bacillus*. In Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). 1973;1:71-88.
39. Васильев ДА, Калдыркаев АИ, Феоктистова НА, Алешкин АВ. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Ульяновск: НИИЦМ и Б УлГСХА им. П.А.Столыпина, 2013. / Vasilev DA, Kaldyrkaev AI, Feoktistova NA, Aleshkin AV. Identifikatsiya bakterii *Bacillus cereus* na osnove ikh fenotipicheskoi kharakteristiki. Ul'yanovsk: NIITsM i B UIGSKhA im. P.A.Stolykina, 2013. (In Russian).
40. Султанов ЗЗ, Кулакова ЛС, Перепелица ЛГ, Абдулганиева СК. Питательная среда для выделения *Bacillus cereus*. Патент 220/2201965.html / Sultanov ZZ, Kulakova LS, Perepelitsa LG, Abdulganieva SK. Pitatel'naya sreda dlya vydeleniya *Bacillus cereus*. Patent 220/2201965.html (In Russian).
41. Феоктистова НА, Калдыркаев АИ, Васильев ДА, Золотухин СН. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора. Вестник Ульяновской ГСХА им. П.А.Столыпина. 2014;1:68-76. / Feoktistova NA, Kaldyrkaev AI, Vasil'ev DA, Zolotukhin SN. Rasprostraneniye *Bacillus cereus* i *Bacillus mycoides* v obektakh sanitarnogo nadzora. Vestnik Ul'yanovskoi GSKhA im. P.A.Stolykina. 2014;1:68-76. (In Russian).
42. Феоктистова НА, Калдыркаев АИ, Мустафин АХ. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*. Биологические науки. 2011;4(32-1):288-290. / Feoktistova NA, Kaldyrkaev AI, Mustafin AKh. Razrabotka skhemy issledovaniya materiala s tsel'yu vydeleniya i uskorennoi identifikatsii bakterii vidov *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*. Biologicheskije nauki. 2011;4(32-1):288-290. (In Russian).
43. Lund T, De Buisser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol Microbiol. 2000 Oct;38(2):254-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x
44. Granum PE, O'Sullivan K, Lund T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 1999 Aug 15;177(2):225-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13736.x
45. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect Immun. 1995 Nov;63(11):4423-8. DOI: 10.1128/iai.63.11.4423-4428.1995
46. Schulten SM, Veld PH, Nagelkerke NJ. Evaluation of the ISO 7932 standard for the enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Int. J. Food. Microbiol. 2000;5:53-63.
47. Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. Appl Environ Microbiol. 2006 Jul;72(7):5118-21. DOI: 10.1128/AEM.00170-06
48. Феоктистова НА, Васильев ДА, Мастиленко АВ. Подбор специфических праймеров на основе гена *16S* рРНК для бактерий «группы *Bacillus cereus*». Вестник Ульяновской ГСХА им. П.А.Столыпина. 2018;3:197-201. / Feoktistova NA, Vasil'ev DA, Mastilenko AV. Podbor spetsificheskikh praimerov na osnove gena *16S* rRНК dlya bakterii «gruppy *Bacillus cereus*». Vestnik Ul'yanovskoi GSKhA im. P.A.Stolykina. 2018;3:197-201. DOI 10.18286/1816-4501-2018-3-196-201 (In Russian).
49. Tallent SM, Kotewicz KM, Strain EA, Bennett RW. Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. J AOAC Int. 2012 Mar-Apr;95(2):446-51. DOI: 10.5740/jaoacint.11-251
50. Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA, et al. Use of *16S* rRNA, *23S* rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. J Clin Microbiol. 2004 Aug;42(8):3711-30. Erratum in: J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2676. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3711-3730.2004
51. Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kasai H. Comparison of *gyrB* gene sequences, *16S* rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. Int J Syst Evol Microbiol. 2007 Aug;57(Pt 8):1846-1850. DOI: 10.1099/ijs.0.64685-0
52. Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, Takano T, Isobe H, Baranovich T, et al. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. J Hosp Infect. 2008 Aug;69(4):361-7. DOI: 10.1016/j.jhin.2008.04.014
53. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
54. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):382-98. DOI: 10.1128/CMR.00073-09

Информация о соавторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хлопова Ксения Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Дятлов Иван Алексеевич, академик Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Nina A. Shishkova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Particularly Dangerous Infections of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ksenia V. Khlopova, Junior Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Galina M. Titareva, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of anthrax Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Aleksander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Highly Dangerous Infections of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

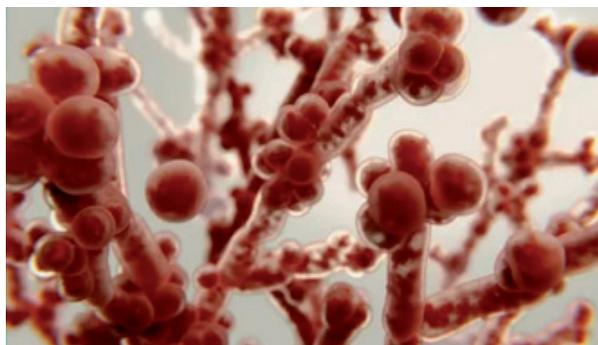
Evgeny A. Tyurin, MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Biological Safety of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DScs, Professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Обнаружен новый способ борьбы с грибковыми инфекциями

Лекарственная устойчивость патогенных грибов в сочетании с ограниченным противогрибковым арсеналом представляет собой растущую угрозу для здоровья человека. Чтобы идентифицировать противогрибковые соединения проверено хранилище натуральных продуктов RIKEN на репрезентативные изоляты четырех основных грибковых патогенов человека. Этот скрининг выявил NPD6433, триазенил-индол с широким спектром активности против всех скрининговых штаммов, а также нитчатой плесени *Aspergillus fumigatus*. Исследования показали, что NPD6433 нацелен на еноилредуктазный домен синтазы жирных кислот 1 (Fas1), ковалентно ингибируя его флаavinмоноклеотид-зависимую активность НАДФН-окисления и останавливая биосинтез незаменимых жирных кислот. Надежное ингибирование Fas1 убивает *Candida albicans*, тогда как сублетальное ингибирование ухудшает различные признаки вирулентности. При хорошей переносимости воздействия NPD6433 продлевал продолжительность жизни нематод, инфицированных устойчивым к азолу *C. albicans*. В целом, идентификация NPD6433 предоставляет инструмент для изучения липидного гомеостаза как терапевтической мишени у патогенных грибов и раскрывает механизм, с помощью которого функция Fas1 может ингибироваться.



Iyer KR, Li SC, Revie NM, Lou JW, Duncan D, Fallah S, et al.
Identification of triazeryl indoles as inhibitors of fungal fatty acid biosynthesis with broad-spectrum activity.
Cell Chem Biol. 2023 Jul 20;30(7):795-810.e8. DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.06.005

Микобактериофаги – вирусы микобактерий

М.В.Фурсов

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

Микобактериофаги – бактериофаги, инфицирующие бактерии рода *Mycobacterium*, – вносят вклад в понимание вирусного разнообразия и эволюции. Более 10 000 микобактериофагов было выделено к настоящему времени, более 2000 геномов секвенировано и размещено в базах данных. Данный обзор посвящен актуальной теме использования микобактериофагов для лечения инфекций, вызванных микобактериями (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. chelonae* и др.), а также истории открытия, классификации и геномике микобактериофагов, их жизненному циклу и хозяйской специфичности.

Ключевые слова: микобактериофаги, *Mycobacterium spp.*, туберкулез

Для цитирования: Фурсов М.В. Микобактериофаги – вирусы микобактерий. Бактериология. 2023; 8(4): 76–79. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-76-79

Mycobacteriophages are viruses of mycobacteria

M.V.Fursov

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

Mycobacteriophages is bacteriophages infecting *Mycobacterium* cells, contributing to the understanding of viral diversity and evolution. More than 10 000 mycobacteriophages have been isolated to date, and more than 2000 genomes have been sequenced and submitted into different databases. This review is devoted to the current topic of using mycobacteriophages to treat infections caused by mycobacteria (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, etc.), as well as the history of discovery, classification and genomics of mycobacteriophages, their life cycle and host specificity.

Key words: mycobacteriophages, *Mycobacterium spp.*, tuberculosis

For citation: Fursov M.V. Mycobacteriophages are viruses of mycobacteria. Bacteriology. 2023; 8(4): 76–79. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-76-79

Бактериофаги – облигатные паразиты бактерий, которые были впервые описаны около ста лет назад и с тех пор их использование вносит значимый вклад в развитие молекулярной биологии, генетики и биотехнологии [1]. Преимущество использования бактериофагов в молекулярно-генетических исследованиях заключается в сравнительно небольшом размере их геномов, что позволило на их основе разрабатывать методы секвенирования ДНК еще до начала 1990-х гг. [2].

Бактериофаги широко распространены в окружающей среде, являясь частью самой распространенной в природе формы биологических объектов – вирусов (количество вирусных частиц в биосфере оценивается как 10^{31}) [3]. Предполагается, что фаговая популяция сформировалась более 3 млрд лет назад, а количество фаговых инфекций оценивается как 10^{23} событий в секунду, обновление мировой популяции происходит каждые несколько дней [4].

Для корреспонденции:

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0000

Статья поступила 01.12.2023, принята к печати 25.12.2023

Генетически бактериофаги очень гетерогенны. Постоянно идет эволюционное «соревнование» между бактериями-хозяевами и фагами по созданию устойчивых к бактериофагам форм и преодолению этой устойчивости [5].

Бактериофаги могут вызывать два типа фаговой инфекции: литическую (вирулентную) и лизогенную (умеренную), причем из лизогенного состояния фаг может быть индуцирован с последующим развитием литической инфекции. Частота лизогении варьирует в зависимости от ряда параметров: видовой принадлежности хозяина, стадии роста бактериальной культуры, множественности инфекции и др. [6].

Микобактериофаги – это бактериофаги, которые инфицируют клетки микобактерий, среди которых выделяют патогенные для человека виды: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* комплекс (MAC) и *Mycobacterium abscessus* комплекс (MAB), а также непатогенные виды,

For correspondence:

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000

The article was received 01.12.2023, accepted for publication 25.12.2023

такие как *Mycobacterium smegmatis* и др. [7]. Интерес к микобактериофагам объясняется тем, что они рассматриваются как кандидаты для разработки новых противотуберкулезных препаратов, которые могли бы внести вклад в решение проблемы терапии множественно-лекарственно устойчивого туберкулеза. К настоящему времени выделены и охарактеризованы более 10 тыс. штаммов микобактериофагов, размещенных в базе данных PhagesDB (<https://phagesdb.org/>, дата доступа 19.11.2023). Микобактериофаги широко используются для изучения генетики микобактерий, в т.ч. интегративных векторов, систем рекомбинации, а также систем эффективной доставки репортерных генов, транспозонов и субстратов аллельного обмена.

Данный обзор посвящен истории открытия микобактериофагов, их классификации, описанию фагового жизненного цикла, структуры геномов и использованию в молекулярной биологии, биотехнологии и медицине.

Открытие микобактериофагов

Первые микобактериофаги были выделены в 1954 г. из культуры *M. smegmatis* и в 1960–1970-х гг. использовались для фаготипирования микобактериальных инфекций. Некоторый из этих фагов сохранились до настоящего времени, а другие были утрачены [8]. Первый геном микобактериофага (L5) был секвенирован в Японии [9]. В дальнейшем были секвенированы геномы фагов D29, TM4 и Vxb1 [10]. В 2002 г. в США стартовала программа Phage Hunters Integrative Research and Education (PHIRE), в 2008 г. преобразованная в программу Science Education Alliance Phage

Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science (SEA-PHAGES), поддерживаемую Медицинским институтом Ховарда [11]. В рамках этих программ был создан большой архив данных о микобактериофагах (>10 000), выделенных на *M. smegmatis*, более 2000 из которых были секвенированы и геномы этих фагов аннотированы. Информация о данной коллекции фагов доступна на веб-ресурсе (<http://phagesdb.org>). На интерактивной карте ресурса представлены локации выделения микобактериофагов во всем мире (рисунок).

Классификация и геномика микобактериофагов

На основании схожести геномов (>50% генома) микобактериофаги сгруппированы в кластеры (А, В, С и т.д.) и подкластеры (например, А1, А2, А3). Фаги, для которых не найдены близкородственные, называются «одиночки» (singletons) [12]. По мере расширения коллекции секвенированных геномов микобактериофагов граница идентичности геномов между кластерами была снижена до 35% [13].

Ключевым параметром геномики микобактериофагов является их архитектурная мозаика. Каждый геном представляет собой композицию модулей, или мозаичных «плиток», которые могут быть собраны в огромное количество различных комбинаций [14]. Кроме того, средний размер генов микобактериофагов составляет около 600 п.н., что меньше такого показателя у бактерий (1000 п.н.), а гены собраны в более протяженные опероны (20–25 т.п.н.), чем у бактерий [15]. Большинство литических микобактериофагов относят к порядку *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae* и кластеру К,



Рисунок. Карта локализации выделения микобактериофагов в GPS-координатах (<https://phagesdb.org/GPSmap/>, дата доступа 30 ноября 2023 г.). Буквами обозначены кластеры микобактериофагов.

Figure. Localization map of mycobacteriophage release in GPS coordinates (<https://phagesdb.org/GPSmap/>, accessed November 30, 2023). Letters indicate clusters of mycobacteriophages.

который подразделяется на 7 подкластеров [16]. Кластер К – один из известных кластеров, в котором все члены могут лизировать *M. tuberculosis*. Представители семейства Siphoviridae имеют длинный гибкий хвост и заостренный капсид, содержащий двухцепочечную ДНК [17]. В геномах около 2000 секвенированных микобактериофагов выявлено большое число генов с неизвестной функцией (>100 тыс.) [7], что указывает на наличие огромного резервуара неизвестных разнообразных функций генов.

Жизненный цикл микобактериофагов

Лизогенный цикл

Большинство выделенных к настоящему времени микобактериофагов относятся к умеренным фагам. Интересно, что литические и умеренные микобактериофаги могут относиться к одному и тому же кластеру, например, литический фаг D29 и умеренный фаг L5 относятся к одному и тому же подкластеру A2, их отличие состоит в наличии делеции гена-репрессора [18]. Умеренные фаги обычно содержат репрессор, который необходим для перехода в состояние лизогении, и интегразу, которая обеспечивает сайт-специфичную интеграцию в бактериальный геном и формирование профага. Некоторые микобактериофаги кластера А отличаются тем, что они формируют профаговые репликоны (плазмидные) за счет наличия системы *parAB* вместо интегразы [19]. У многих бактериофагов (кроме отмеченных выше из кластера А) ген-репрессор локализуется и транскрибируется среди ранних литических генов [20]. Формирование иммунности к суперинфекции у микобактериофагов отличается от канонической, описанной у бактериофага λ. Гены репрессора и интегразы котранскрибируются в опероне, и рекомбинация с *attP* сайтом происходит внутри самого гена-репрессора. Интеграция приводит к утрате 3' конца гена-репрессора, что приводит к продукции усеченного на С-конце белка-репрессора, который не подвергается протеолитической деградации и обеспечивает состояние иммунности к суперинфекции [21].

Литический цикл

Транскриптомный анализ показал, что многие микобактериофаги содержат два основных паттерна литических генов: ранние (~30 мин после инфекции) и поздние (~120 мин после инфекции) [22]. Промоторы ранних генов опознаются РНК-полимеразой клетки-хозяина по сайтам -35 и -10 [23]. Поздние гены считываются выше или начиная с последовательности *cos*-сайта, но процесс этот еще недостаточно изучен.

Хозяйская специфичность

В настоящее время хозяйская специфичность микобактериофагов изучена недостаточно. Важные сведения были получены при изучении спектров чувствительности к микобактериофагам клинических штаммов *M. tuberculosis* и *M. abscessus*, а также *M. smegmatis* [24, 25]. Была обнаружена корреляция между способностью фагов инфицировать два штамма – *M. smegmatis* mc²155 и *M. tuberculosis* H37Rv – и принадлежностью к определенному кластеру/подкластеру [26]. Фаги, изолированные на штамме *M. smegmatis* mc²155, за некоторыми исключениями, эффективно заражали *M. tuberculosis* H37Rv и другие штаммы туберкулезного ми-

кроба [25]. Специфичность микобактериофагов определяется множеством факторов, которые можно подразделить на действующие на поверхности клетки (например, рецепторы) и действующие после проникновения ДНК фага в клетку-хозяина (например, рестрикция). Известно, что многие штаммы вирулентных микобактерий не содержат CRISPR-систем, что исключает влияние таких систем на ограничение спектра активности микобактериофагов [27].

Терапевтическое использование микобактериофагов

Первое сообщение о применении микобактериофага в качестве терапевтического препарата было опубликовано в журнале Nature в 2019 г.: лечение детского муковисцидоза, вызванного диссеминированной инфекцией *M. abscessus*, с последующей двусторонней трансплантацией легких и иммуносупрессивной терапией. Примерно через 6 нед. лечения микобактериофагом наблюдалось значительное улучшение: уменьшение размеров узелков в печени и на коже, а также закрытие хирургической раны [28].

Позже были опубликованы результаты лечения еще 20 случаев инфекции, вызванных высокорезистентными штаммами *M. abscessus*. Как минимум в 11 случаях были отмечены благоприятные клинические или микробиологические результаты фаговой терапии, в 5 случаях – неполное излечение и в 4 случаях – незначительные изменения эффекта терапии [29].

Еще один случай успешной микобактериофаговой терапии описан при лечении в течение года инфекции *M. abscessus* у пациента с муковисцидозом в 2022 г. У пациента была достигнута эрадикация патогена, он был повторно включен в список для двусторонней трансплантации легких [30].

В этом же году был опубликован случай успешной фаговой терапии при внутривенном введении микобактериофага на фоне антибиотикотерапии пациенту с высокорезистентной кожной инфекцией *Mycobacterium chelonae* [31].

Сообщений об успешном применении микобактериофагов в качестве терапевтических препаратов пока не опубликовано. Трудности данного типа терапии заключаются в том, что клетки *M. tuberculosis* способны выживать внутри фагосом макрофагов, возможность доставки микобактериофагов в которые остается дискуссионной. На данный момент предложено два способа доставки фагов внутрь макрофагов: использование липосомированных препаратов микобактериофагов и авирулентных микобактерий для реализации стратегии «Троянский конь» [32, 33].

Глобальное распространение во всем мире штаммов *M. tuberculosis*, обладающих широкой лекарственной устойчивостью, и рост заболеваемости туберкулезом, вызванным подобными штаммами, указывает на необходимость поиска новых терапевтических препаратов, в т.ч. микобактериофагов или их компонентов, в комбинации с уже известными противотуберкулезными препаратами.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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

- Elois MA, Silva RD, Pilati GVT, Rodríguez-Lázaro D, Fongaro G. Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*. 2023 Jan 26;15(2):349. DOI: 10.3390/v15020349
- Klump J, Fouts DE, Sozhamannan S. Next generation sequencing technologies and the changing landscape of phage genomics. *Bacteriophage*. 2012 Jul 1;2(3):190-199. DOI: 10.4161/bact.22111
- Mushegian AR. Are There 1031 Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *J Bacteriol*. 2020 Apr 9;202(9):e00052-20. DOI: 10.1128/JB.00052-20
- Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*. 2002 Jun;61(4):471-80. DOI: 10.1006/tpbi.2002.1590
- Bernheim A, Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat Rev Microbiol*. 2020 Feb;18(2):113-119. DOI: 10.1038/s41579-019-0278-2
- Gummalla VS, Zhang Y, Liao YT, Wu VCH. The Role of Temperate Phages in Bacterial Pathogenicity. *Microorganisms*. 2023 Feb 21;11(3):541. DOI: 10.3390/microorganisms11030541
- Hatfull GF. Mycobacteriophages: From Petri dish to patient. *PLoS Pathog*. 2022 Jul 7;18(7):e1010602. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010602
- Engel HW. Mycobacteriophages and phage typing. *Ann Microbiol (Paris)*. 1978;129(1):75-90.
- Doke S. Studies on mycobacteriophages and lysogenic Mycobacteria. *J Kumamoto Med Soc*. 1960;34:1360-73.
- Mediavilla J, Jain S, Kriakov J, Ford ME, Duda RL, Jacobs WR Jr, et al. Genome organization and characterization of mycobacteriophage Bxb1. *Mol Microbiol*. 2000 Dec;38(5):955-70. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02183.x
- Hanauer DI, Graham MJ, Sea P, Betancur L, Bobrownicki A, Cresawn SG, et al. An inclusive Research Education Community (iREC): Impact of the SEA-PHAGES program on research outcomes and student learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 19;114(51):13531-13536. DOI: 10.1073/pnas.1718188115
- Hatfull GF, Pedulla ML, Jacobs-Sera D, Cichon PM, Foley A, Ford ME, et al. Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. *PLoS Genet*. 2006 Jun;2(6):e92. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020092
- Pope WH, Mavrich TN, Garlena RA, Guerrero-Bustamante CA, Jacobs-Sera D, Montgomery MT, et al. Bacteriophages of *Gordonia* spp. Display a Spectrum of Diversity and Genetic Relationships. *mBio*. 2017 Aug 15;8(4):e01069-17. DOI: 10.1128/mBio.01069-17
- Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):171-82. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00233-2
- Hatfull GF, Jacobs-Sera D, Lawrence JG, Pope WH, Russell DA, Ko CC, et al. Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size. *J Mol Biol*. 2010 Mar 19;397(1):119-43. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.01.011
- Mayer O, Jain P, Weisbrod TR, Biro D, Ho L, Jacobs-Sera D, et al. Fluorescent Reporter DS6A Mycobacteriophages Reveal Unique Variations in Infectibility and Phage Production in Mycobacteria. *J Bacteriol*. 2016 Nov 4;198(23):3220-3232. DOI: 10.1128/JB.00592-16
- Guo S, Ao Z. Phage in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jun 1;17(7):2691-7. DOI: 10.2741/4080
- Dedrick RM, Mavrich TN, Ng WL, Hatfull GF. Expression and evolutionary patterns of mycobacteriophage D29 and its temperate close relatives. *BMC Microbiol*. 2017 Dec 2;17(1):225. DOI: 10.1186/s12866-017-1131-2
- Wetzel KS, Aull HG, Zack KM, Garlena RA, Hatfull GF. Protein-Mediated and RNA-Based Origins of Replication of Extrachromosomal Mycobacterial Prophages. *mBio*. 2020 Mar 24;11(2):e00385-20. DOI: 10.1128/mBio.00385-20
- Petrova ZO, Broussard GW, Hatfull GF. Mycobacteriophage-repressor-mediated immunity as a selectable genetic marker: Aephagia and BPs repressor selection. *Microbiology (Reading)*. 2015 Aug;161(8):1539-1551. DOI: 10.1099/mic.0.000120
- Little JW. Evolution of complex gene regulatory circuits by addition of refinements. *Curr Biol*. 2010 Sep 14;20(17):R724-34. DOI: 10.1016/j.cub.2010.06.028
- Dedrick RM, Guerrero Bustamante CA, Garlena RA, Pinches RS, Cornely K, Hatfull GF. Mycobacteriophage ZoeJ: A broad host-range close relative of mycobacteriophage TM4. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019 Mar;115:14-23. DOI: 10.1016/j.tube.2019.01.002
- Broussard GW, Oldfield LM, Villanueva VM, Lunt BL, Shine EE, Hatfull GF. Integration-dependent bacteriophage immunity provides insights into the evolution of genetic switches. *Mol Cell*. 2013 Jan 24;49(2):237-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.012
- Dedrick RM, Smith BE, Garlena RA, Russell DA, Aull HG, Mahalingam V, et al. *Mycobacterium abscessus* Strain Morphotype Determines Phage Susceptibility, the Repertoire of Therapeutically Useful Phages, and Phage Resistance. *mBio*. 2021 Mar 30;12(2):e03431-20. DOI: 10.1128/mBio.03431-20
- Guerrero-Bustamante CA, Dedrick RM, Garlena RA, Russell DA, Hatfull GF. Toward a Phage Cocktail for Tuberculosis: Susceptibility and Tuberculocidal Action of Mycobacteriophages against Diverse *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *mBio*. 2021 May 20;12(3):e00973-21. DOI: 10.1128/mBio.00973-21
- Jacobs-Sera D, Marinelli LJ, Bowman C, Broussard GW, Guerrero Bustamante C, Boyle MM, et al; Science Education Alliance Phage Hunters Advancing Genomics And Evolutionary Science Sea-Phages Program; Modlin RL, Hendrix RW, Hatfull GF. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology*. 2012 Dec 20;434(2):187-201. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.026
- Shankar S, Tyagi AK. Purification and characterization of restriction endonuclease MgoI from *Mycobacterium goodii*. *Gene*. 1993 Sep 6;131(1):153-4. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90686-w
- Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Sothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*. 2019 May;25(5):730-733. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z
- Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, Freeman KG, Jacobs-Sera D, Belessis Y, et al. Phage Therapy of *Mycobacterium* Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease. *Clin Infect Dis*. 2023 Jan 6;76(1):103-112. DOI: 10.1093/cid/ciac453
- Nick JA, Dedrick RM, Gray AL, Vladar EK, Smith BE, Freeman KG, et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell*. 2022 May 26;185(11):1860-1874.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2022.04.024
- Little JS, Dedrick RM, Freeman KG, Cristinziano M, Smith BE, Benson CA, et al. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. *Nat Commun*. 2022 May 3;13(1):2313. DOI: 10.1038/s41467-022-29689-4
- Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, Chacón O, Wagner D, McGarvey J, et al. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1155-60. DOI: 10.1086/343812
- Foley-Thomas EM, Whipple DL, Bermudez LE, Barletta RG. Phage infection, transfection and transformation of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Microbiology (Reading)*. 1995 May;141(Pt 5):1173-1181. DOI: 10.1099/13500872-141-5-1173

Разработка набора сывороток диагностических шигеллезных и освоение его производства

Т.Ю.Гашенко^{1,2}, С.Г.Марданлы^{1,2}

¹Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация;

²Государственный гуманитарно-технологический университет, Орехово-Зуево, Российская Федерация

В статье охарактеризована медико-социальная значимость шигеллезов (бактериальной дизентерии) и обоснована необходимость обеспечения отечественного здравоохранения наборами диагностических сывороток, необходимых для идентификации выделяемых от пациентов шигелл. Описаны проблемы, решение которых потребовалось при разработке набора «Сыворотки диагностические шигеллезные адсорбированные для реакции агглютинации» и освоении его промышленного производства. Изложены основные моменты разработанной технологии производства.

Ключевые слова: шигеллезы, этиологическая диагностика, реакция агглютинации, сыворотки диагностические, промышленное производство

Для цитирования: Гашенко Т.Ю., Марданлы С.Г. Разработка набора сывороток диагностических шигеллезных и освоение его производства. Бактериология. 2023; 8(4): 80–84. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-80-84

Development of a set of diagnostic shigellosis serums and mastering its production

T.Yu.Gashenko^{1,2}, S.G.Mardanly^{1,2}

¹Closed Joint Stock Company «ECOlab», Elektrogorsk, Russian Federation;

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

The article characterizes the medical and social significance of shigellosis (bacterial dysentery) and substantiates the need to provide domestic healthcare with sets of diagnostic serums necessary for the identification of shigella secreted from patients. The problems, the solution of which was required during the development of the set «Diagnostic shigellosis adsorbed serums for agglutination reaction» and the development of its industrial production, are described. The main points of the developed production technology are outlined.

Key words: shigellosis, etiological diagnosis, agglutination reaction, diagnostic sera, industrial production

For citation: Gashenko T.Yu., Mardanly S.G. Development of a set of diagnostic shigellosis serums and mastering its production. Bacteriology. 2023; 8(4): 80–84. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-80-84

Шигеллез (бактериальная дизентерия) – это антропонозная инфекция, возбудители которой, бактерии рода *Shigella*, входят в семейство *Enterobacteriaceae*. Род представлен четырьмя серогруппами [1, 2]:

- серогруппа А включает вид *Sh. dysenteriae* и объединяет 15 серотипов;
- серогруппа В включает вид *Sh. flexneri* и объединяет 6 серотипов с подтипами и 2 варианта;
- серогруппа С включает вид *Sh. boydii* и состоит из 19 серотипов;
- серогруппа D включает вид *Sh. sonnei* и содержит 1 серотип, подразделяющийся на 7 биохимических вариантов (хемоваров).

Для корреспонденции:

Гашенко Татьяна Юрьевна, кандидат биологических наук, генеральный директор ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская обл., Электрогорск, ул. Будённого, 1
Телефон: (800) 333-3347

Статья поступила 30.06.2023, принята к печати 25.12.2023

Отмечено, что серогруппы А, В и С очень похожи физиологически, в то время как *Sh. sonnei* можно отличить от других серогрупп по положительным биохимическим реакциям β-D-галактозидазы и орнитиндекарбоксилазы [2].

Чаще всего встречаются шигеллезы, вызванные *Sh. sonnei* и *Sh. flexneri* [1].

Основным методом диагностики шигеллезов является бактериологический, который позволяет выделить чистую культуру возбудителя (копрокультуру) и изучить ее свойства. Материалом для исследования служат испражнения, пищевые продукты, иногда – рвотные массы. Выделенные культуры шигелл идентифицируют до вида и серотипа, культуры *Sh. flexneri* – до подтипов, а культуры *Sh. sonnei* – до хемовара.

For correspondence:

Tatyana Yu. Gashenko, PhD in Biological Sciences, General Director of Closed Joint Stock Company ECOlab

Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-3347

The article was received 30.06.2023, accepted for publication 25.12.2023

ров. Для установления видовой принадлежности возбудителя используют реакцию агглютинации (РА) на стекле, которую сначала ставят с видовыми сыворотками Зонне и Флекснера, а при выделении палочки Флекснера – с типовыми сыворотками. Для этого используют поливалентные и моновалентные диагностические агглютинирующие сыворотки [1, 2].

Заболевание, вызываемое *Sh. dysenteriae*, имеет преимущественно контактно-бытовой путь передачи возбудителя, *Sh. flexneri* – водный, а *Sh. sonnei* – алиментарный. Шигеллезы распространены повсеместно, обычно они проявляются в виде вспышек алиментарного или водного характера [1, 2]. Шигеллезы эндемичны для развивающихся стран с плохими санитарными условиями. Обычно от 10 до 20% кишечных заболеваний и 50% случаев кровавой диареи или дизентерии у детей раннего возраста можно охарактеризовать как шигеллез, и распространенность этих инфекций значительно снижается после пяти лет жизни [2]. В развитых странах вспышки из одного источника, передающиеся через пищу или воду, происходят спорадически, и очаги эндемичного шигеллеза можно обнаружить в учреждениях и в отдаленных районах с некачественными санитарными условиями.

Ежегодно в мире регистрируется около 200 млн случаев заболеваний шигеллезом, из которых 1,1 млн больных умирает. Однако, согласно проведенным исследованиям с применением методов математического моделирования, на каждый случай дизентерии, попадающий в поле зрения медицинской службы, приходится 4 неустановленных случая. Еще более феномен «айсберга» выражен при шигеллезе, вызываемом *Sh. flexneri*, – 10–15 неустановленных случаев, и он достигает максимальных показателей при дизентерии, вызываемой *Sh. sonnei* – до 50 неустановленных случаев на 1 установленный [3].

Согласно данным ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора [3], за период 2012–2014 гг. в России заболеваемость шигеллезом снизилась в 15 раз: с 80 500 случаев в 2002 г. до 6500 случаев в январе–августе 2014 г. (показатель заболеваемости, соответственно: 55,96 и 4,5 на 100 тыс. населения).

Тем не менее шигеллезы отнюдь не утратили своего медико-социального значения, поскольку доля детей возрасте до 14 лет среди заболевших остается практически неизменной и составляет 47–57% [3], а в Вооруженных Силах Российской Федерации в структуре острых кишечных диарейных инфекций удельный вес шигеллеза достигает 25% и сохраняется высокой долей случаев диарей неустановленной этиологии (до 82%) [4]. Ежегодно в Российской Федерации регистрируются десятки тысяч заболеваний разными нозологическими формами дизентерии. Только в 2013 г. экономический ущерб, причиненный шигеллезами, составил 567 481,6 тыс. руб. [5]. Кроме того, по данным М.О.Антипова, А.Я.Миндлиной [6], удельный вес шигеллезом в структуре антропонозных заболеваний органов пищеварения после существенного снижения в 2007–2011 гг. практически не менялся в 2012–2018 гг.

С учетом того, что в диагностике шигеллезом основной удельный вес занимают результаты лабораторного исследования, задача обеспечения отечественного здравоохранения средствами этиологической лабораторной диагностики

шигеллезом вполне актуальна и в настоящее время. А поскольку одним из наиболее доступных для большинства отечественных клинических лабораторий методов идентификации возбудителей шигеллезом на сегодняшний день остается оценка в РА серотипа бактерий, выделенных при бактериологическом обследовании пациента, разработка и организация производства наборов диагностических сывороток, содержащих специфические антитела к антигенам – маркерам серотипов шигелл, также по-прежнему актуальны.

Соответствующая работа была проведена сотрудниками ЗАО «ЭКОлаб» с учетом опыта, накопленного за годы производства наборов реагентов для лабораторной диагностики иммунохимическими методами [7–9]. Ее итогом явился набор «Сыворотки диагностические шигеллезные адсорбированные для реакции агглютинации». Набор включает 49 вариантов комплектации, отличающихся составом входящих в них сывороток (таблица).

Каждый вариант представлен 4 подвариантами по агрегатному состоянию сывороток – сухими (подварианты /1 и /2) и жидкими (подварианты /3-/4) сыворотками, разлитыми во флаконы по 1,0 мл (подварианты /1 и /3) или по 2,0 мл (подварианты /2 и /4). Кроме того, во всех вариантах, кроме варианта 1, предусмотрен розлив каждого наименования сыворотки в 1 или 5 флаконов (в варианте 1 предусмотрен розлив каждого наименования сыворотки только в 1 флакон), что в итоге дает 388 способов комплектации набора (при этом в подвариантах 1/1–1/4 будет по 48 флаконов с сыворотками, а в остальных – по 1 или по 5 флаконов). Все это существенно расширяет возможности потребителя выбирать только необходимые ему комплекты сывороток.

В отличие от наборов шигеллезных диагностических сывороток других российских производителей набор, разработанный специалистами ЗАО «ЭКОлаб», включает не только лиофилизированные, но и жидкие сыворотки. Хотя сроки хранения жидких сывороток значительно меньше, чем лиофилизированных, жидкие сыворотки более удобны в использовании, поскольку не требуют предварительной регидратации.

Разработка набора и технологии его производства была начата с определения перечня видов шигелл, идентификация которых должна обеспечиваться входящими в него сыворотками. Поскольку подобные наборы уже представлены на отечественном рынке, за основу был взят перечень видов, использованный в наборе шигеллезных сывороток «Агнолла» (НИИВС, Санкт-Петербург). Необходимые для производства музейные штаммы шигелл были получены из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Использование музейных штаммов шигелл предполагает не только хранение, но и периодическое обновление их эталонных культур, для чего в ампулы с сухими музейными культурами вносят по 1,0 мл бульона Хоттингера, после растворения сухой массы переносят содержимое ампул в пробирки с бульоном Хоттингера, выдерживают пробирки 4–6 ч в термостате при 37°C, после чего пересевают бульонную культуру на чашки Петри с питательным агаром и выдерживают их при 37°C 18–20 ч. Колонии, выросшие на агаре, просматривают под микроскопом в косопадающем свете и отбирают 5–15 колоний в S-форме (колонии с ровным краем,

гладкой поверхностью, серо-голубого цвета). Каждую из отобранных колоний пересевают на 2 пробирки со скошенным агаром, инкубируют их 18–20 ч при 37°C. Культуру из одной пробирки смывают физиологическим раствором и испытывают в пробе кипячения, РА на стекле и в пробирочной РА с соответствующей сывороткой. При положительных результатах контроля отобранные культуры пересевают на среду Дорсе и хранят полученные культуры при 2–8°C, или

замораживают их в криопробирках и хранят далее при -60...-80°C, или передают на лиофильную сушку. На среде Дорсе под парафинированными ватными пробками при температуре 2–8°C культуры сохраняют свойства до 6 мес., после чего должен быть проведен их пересев, лиофилизированные культуры хранят до 5 лет при температуре 2–8°C, культуры в криопробирках хранят до использования при -60...-80°C, срок их хранения практически не ограничен (по опыту работы, не менее 10 лет).

Хотя принципиальная технологическая схема производства диагностических сывороток – наработка бактериальной массы и получение из нее препарата для иммунизации животных-продуцентов, подготовка животных-продуцентов, их иммунизация, отбор у них крови, получение и переработка сыворотки крови – хорошо известна, опыт освоения производства аналогичных препаратов – эшерихиозных и сальмонеллезных диагностических сывороток – показал необходимость отработки конкретных технологических параметров каждой стадии.

Так, на стадии получения антигенов для иммунизации животных-продуцентов культуры штаммов, обладающих наилучшими антигенными свойствами, пересевают со среды Дорсе на пробирки со скошенным агаром Хоттингера (каждую культуру на одну пробирку), помещают в термостат на 18–20 ч при 37°C. Полученные пробирочные культуры смывают бульоном Хоттингера (по 10–15 мл бульона на пробирку), смывом засевают флаконы с бульоном Хоттингера, которые помещают в термостат на 4 ч при 37°C для получения маточных культур. По 10–15 мл полученных маточных культур вносят в матрасы со скошенным мясопептонным агаром, матрасы помещают агаром вверх в термостат и инкубируют 18–20 ч при 37°C. Полученные агаровые культуры смывают стерильным физиологическим раствором с 0,5% формалина (по 20 мл раствора на матрас), смывы одноименных культур объединяют в бутылки и инкубируют 18–20 ч при 37°C. Доводят концентрацию микробной массы в бутылках до 3–4 млрд микробных тел/мл по стандарту мутности и центрифугируют полученную взвесь 1 ч при 3000 об./мин. К полученному осадку добавляют 50%-й водный раствор глицерина (3,5 мл раствора на микробную массу, полученную с одного матраса), выдерживают полученную взвесь 10–14 суток при 2–8°C и доводят концентрацию полученной взвеси до 100 млрд микробных тел по стандарту мутности. Готовый препарат антигена хранят до использования при 2–10°C не более 6 мес.

Располагая необходимым набором музейных и рабочих культур, а также технологией получения бактериальной биомассы и ее переработки в препараты антигенов для иммунизации животных-продуцентов, можно было переходить к отработке технологии получения иммунных сывороток.

На этих стадиях готовят животных-продуцентов (кроликов). Определяют необходимое количество антигена для иммунизации; стандартизованный шигеллезный антиген с концентрацией 100 млрд микробных тел/мл по оптической плотности разводят в 100 раз стерильным физиологическим раствором до концентрации 1 млрд микробных тел в 1 мл.

Иммунизируют животных-продуцентов, вводя антигены в краевую вену уха кролика по 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 и 6,0 мл с четырехсуточными интервалами между инъекциями.

Таблица. Варианты комплектации набора «Сыворотки диагностические шигеллезные адсорбированные для реакции агглютинации»

Table. Options for completing the kit «Diagnostic sera for shigellosis adsorbed for the agglutination reaction»

Вариант / Option	Состав сывороток / Serum composition
1	Сыворотки поливалентные / Polyvalent serums <i>Sh. flexneri</i> I, II, III, IV, V, VI, <i>Sh. sonnei</i> <i>Sh. flexneri</i> I, II, III, IV, V <i>Sh. dysenteriae</i> 1, 2 <i>Sh. dysenteriae</i> 3, 4, 5, 6, 7 <i>Sh. dysenteriae</i> 8, 9, 10, 11, 12 <i>Sh. boydii</i> 1; 2; 4; 5; 7; 9; 12 <i>Sh. boydii</i> 3, 6, 8, 10, 11 <i>Sh. boydii</i> 13, 14, 15, 16, 17, 18 Сыворотки типовые к / Standard serums for <i>Sh. flexneri</i> I; II; III; IV; V; VI Сыворотки групповые к антигенам / group sera to antigens <i>Sh. flexneri</i> 3, 4; 6; 7; 8 Сыворотки моновалентные к антигенам / Monovalent sera to antigens <i>Sh. sonnei</i> I, II фазы Сыворотки моновалентные к / Monovalent sera to antigens <i>Sh. dysenteriae</i> 1;2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 Сыворотки моновалентные к / Monovalent sera to antigens <i>Sh. boydii</i> 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18
2	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. flexneri</i> I, II, III, IV, V, VI и <i>Sh. sonnei</i>
3	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. flexneri</i> I, II, III, IV, V
4	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. dysenteriae</i> 1, 2
5	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. dysenteriae</i> 3, 4, 5, 6, 7
6	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. dysenteriae</i> 8, 9, 10, 11, 12
7	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. boydii</i> 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12
8	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. boydii</i> 3, 6, 8, 10, 11
9	Сыворотка поливалентная к / polyvalent serum <i>Sh. boydii</i> 13, 14, 15, 16, 17, 18
10	Сыворотка моновалентная к антигенам / Monovalent serum to antigens I, II фазы <i>Sh. sonnei</i>
11–16	Сыворотки типовые соответственно к / Standard sera according to <i>Sh. flexneri</i> I–VI
17	Сыворотка моновалентная групповая к антигенам / monovalent serum group to antigens 3, 4 <i>Sh. flexneri</i>
18	Сыворотка моновалентная групповая к антигену / monovalent serum group to antigen 6 <i>Sh. flexneri</i>
19	Сыворотка моновалентная групповая к антигенам / monovalent serum group to antigens 7, 8 <i>Sh. flexneri</i>
20–31	Сыворотки моновалентные соответственно к / monovalent sera according to <i>Sh. dysenteriae</i> 1–12
32–49	Сыворотки моновалентные соответственно к / monovalent sera according to <i>Sh. boydii</i> 1–18

На 6-е сутки после последней инъекции делают пробное кровопускание, для чего из краевой вены уха кролика отбирают 2–3 мл крови, ждут ее свертывания и выдерживают в термостате 1 ч при 37°C, после чего определяют ее специфическую активность в РА.

В полученной моновалентной сыворотке специфическую активность определяют в развернутой РА в пробирках, используя в качестве диагностикумов гомологичные культуры шигелл, выращенные на мясопептонном агаре в течение 18–20 ч при 37°C, смытые физиологическим раствором (концентрация микробной взвеси при этом должна составлять 10 единиц по стандарту мутности, или $8,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) и прогретые на водяной бане при температуре 100°C в течение 1 ч. Если титр антител в сыворотке будет не ниже 1:512, проводят производственное кровопускание.

Поливалентные сыворотки контролируют в РА на стекле, используя в качестве диагностикумов живые культуры всех штаммов, входящих в состав поливалентных антигенов. Титр поливалентных сывороток в РА на стекле с живой культурой к каждому антигену должен быть не ниже 1:10; в этом случае проводят производственное кровопускание.

Если титры сывороток в РА менее указанных, производят дополнительно инъекцию антигена по 6,0 мл с повторным взятием пробы на 6-е сутки после дополнительной инъекции.

Производственное кровопускание выполняют в три приема – два частичных (на 7-е и 9-е сутки после введения последней дозы антигена отбирают из краевой вены по 70–80 мл крови) и тотальное (отбирают 80–100 мл крови из сонной артерии).

Отобранную кровь выдерживают 1 ч в термостате при 37°C, отбирают сыворотку, добавляют в нее хлороформ (по 5 мл на 1 л сыворотки) и выдерживают не менее 2 мес. при 2–10°C для стабилизации белков и снижения титра гетерологичных антител.

Перед смешиванием одноименных сывороток, полученных от различных кроликов (сведением их в серию), готовят их микросмеси, т.е. смешивают малые объемы одноименных сывороток разных кровопусканий в соотношениях, соответствующих соотношениям объемов сывороток, подлежащих сведению в серию. Контролируют специфическую активность и специфичность микросмесей в РА на стекле. При положительных результатах контроля одноименные специфичные сыворотки сводят в серию (сливают их в стерильную бутылку).

Следующей стадией технологического процесса, потребовавшей отработки, явилась очистка полученных гипериммунных сывороток от антител, гетерологичных группам, видам и серотипам шигелл, для идентификации которых предназначаются полученные сыворотки. Отработанная технология сводится к смешению полученных сывороток с адсорбентами, приготовленными из суточных бульонных культур штаммов шигелл, гетерологичных идентифицируемым. Адсорбент может быть получен двумя способами – формализацией или прогреванием бульонной культуры, полученной следующим образом: культуру отобранного штамма пересевают со среды Дорсе на пробирки с бульоном и выдерживают засеянные пробирки 4–6 ч при 37°C, после чего 1–2 мл маточной культуры переносят во флакон с бульоном

и инкубируют на орбитальном шейкере 18–24 ч при 37°C и 100–110 об./мин.

Для получения формализованного адсорбента в суточную бульонную культуру, выращенную во флаконе, вносят формалин, выдерживают смесь сутки при 37°C, затем центрифугируют и полученный осадок суспендируют в равном объеме стерильного физиологического раствора; полученный адсорбент хранят до 6 мес. при 2–10°C. Для получения гетерологичного адсорбента бульонную культуру, выращенную во флаконе, 2,5 ч автоклавируют (в режиме проточного пара) при 100°C, центрифугируют, осадок промывают физиологическим раствором и вновь центрифугируют, после чего полученный осадок разводят в равном объеме физиологического раствора; полученный адсорбент хранят до 3 мес. при 2–10°C.

Смешение бульонной культуры с адсорбентом приводит к связыванию гетерологичных антител с клетками адсорбента, последующее центрифугирование в течение 30 мин при 3000 об./мин удаляет их из сыворотки. Затем в РА на стекле определяется полнота адсорбции гетерологичных антител и специфическая активность адсорбированных сывороток.

После удаления гетерологичных антител сыворотки передают на стадию стерилизующей фильтрации; из отфильтрованных сывороток отбирают пробу для контроля pH, специфической активности, стерильности и при положительных результатах контроля хранят до розлива в герметично закрытых емкостях при 2–8°C.

При выпуске жидких сывороток их разливают в асептических условиях по флаконам, флаконы герметично укупоривают стерильными пробками и пластмассовыми навинчиваемыми крышками. При выпуске сухих сывороток после их розлива флаконы неплотно закрывают стерильными пробками для лиофильной сушки, кассеты с флаконами размещают в морозильной камере и выдерживают в ней не менее 24 ч при температуре -40...-80°C, после чего кассеты размещают в камере вакуум-сушильного аппарата и проводят лиофилизацию в соответствии с графиком сушки. По окончании лиофилизации флаконы плотно укупоривают пробками и закрывают навинчиваемыми крышками.

Укупоренные флаконы передают на маркировку, упаковку в групповую тару (коробки с соответствующим комплектом набора), коробки упаковывают в транспортировочную тару, маркируют ее и передают на склад готовой продукции, где хранят до отправки потребителям при 2–8°C.

Конечный продукт – сыворотки в укупоренных и маркированных флаконах, помещенные в маркированную групповую тару, проходят приемочный контроль, в процессе которого оценивается их соответствие требованиям ТУ по физическим свойствам, микробиологической чистоте, специфической активности и специфичности; в лиофилизированных сыворотках оценивается также потеря в массе при высушивании.

Сыворотки, приготовленные по изложенной технологии, успешно прошли технические и клинико-лабораторные испытания, по их результатам для вероятности 0,95 диагностическая чувствительность набора составила не менее 99,2%, а диагностическая специфичность – не менее 97,54%. Набор зарегистрирован Росздравнадзором – Регистрационное

удостоверение №РЗН 2021/15846 от 25.11.2021. За время, прошедшее после регистрации, произведено и реализовано уже около 5000 наборов.

Информация о финансировании

Работа выполнена на средства ЗАО «ЭКОлаб».

Funding information

The work was carried out at the expense of EKOlab CJSC.

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. Литусов НВ. Шигеллы. Иллюстрированное учебное пособие. Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2012.
2. Hale ThL, Keusch GT. Shigella. In: Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 22.
3. Шигеллез у взрослых. Клинические рекомендации. МЗ РФ, 2016.
4. Методические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению дизентерии и других острых кишечных диарейных инфекций в Вооруженных Силах Российской Федерации. М.: Главное военно-медицинское управление МО РФ, 2019.
5. Каира АН, Соломай ТВ. Современное состояние заболеваемости шигеллезами в Российской Федерации. Санитарный врач. 2014;6:16-21.
6. Антипов МО, Миндлина АЯ. Эпидемиологическая характеристика наиболее актуальных болезней органов пищеварения инфекционной природы в регионах России. Профилактическая медицина. 2020;23(3):76-80.
7. Марданлы СГ, Колесников ПС, Мишуткина ЯВ, Юминова НВ. Животные-производители биологического сырья. Рекомендации по содержанию и использованию. Учебное пособие по микробиологии для студентов фармацевтического факультета. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2022.
8. Марданлы СГ, Мишуткина ЯВ, Симонов ВВ. Животные-производители. Деонтология содержания и использования. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2018.

9. Марданлы СГ, Симонов ВВ, Авдонина АС. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2017.

References

1. Litusov NV. Shigella, an illustrated textbook. Ekaterinburg: Izd-vo UGMA, 2012. (In Russian).
2. Hale ThL, Keusch GT. Shigella. In: Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 22.
3. Shigellosis in adults. Clinical recommendations. MZ RF, 2016. (In Russian).
4. Methodological recommendations for the prevention, diagnosis and treatment of dysentery and other acute intestinal diarrheal infections in the Armed Forces of the Russian Federation. Moscow: Glavnoe voenno-meditsinskoe upravlenie MO RF, 2019. (In Russian).
5. Kaira AN, Solomai TV. The current state of the incidence of shigellosis in the Russian Federation. Sanitarnyj vrach. 2014;6:16-21. (In Russian).
6. Antipov MO, Mindlina AY. Epidemiological characteristics of the most urgent diseases of the digestive organs of infectious nature in the regions of Russia. Profilakticheskaja medicina. 2020;23(3):76-80. (In Russian).
7. Mardanly SG, Kolesnikov PS, Mishutkina YaV, Yuminova NV. Animals are producers of biological raw materials. Recommendations for content and use. A textbook on microbiology for students of the Faculty of Pharmacy. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2022. (In Russian).
8. Mardanly SG, Mishutkina YaV, Simonov VV. Animals are producers. Deontology of content and use. Orekhovo-Zuevo: Redakcionno-izdatel'skij otdel GGTU, 2018. (In Russian).
9. Mardanly SG, Simonov VV, Avdonina AS. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2017. (In Russian).

Информация о соавторе:

Марданлы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, заслуженный работник здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», директор по науке, президент компании ЗАО «ЭКОлаб»

Information about co-author:

Seifaddin G. Mardanly, MD, PhD, DSc, Honored Healthcare Worker of the Russian Federation, Professor of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines, State University of Humanities and Technology, Director for Science, President of Closed Joint Stock Company EKOlab

НОВОСТИ НАУКИ

Видовая идентификация штаммов *Mycobacterium leprae*, выявленных на территории Российской Федерации, с использованием последовательности гена субъединицы 16 рибосомальной РНК

Для образцов, содержащих смесь ДНК человека и *Mycobacterium leprae*, полученных от двух пациентов из Российской Федерации, определена последовательность гена 16S РНК и его промоторной области. Показано совпадение полученной последовательности с референсным штаммом, депонированным в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI, США). Анализ проводили методом секвенирования по Сэнгеру с использованием в качестве матрицы смеси ДНК микроорганизмов и человека, выделенной из кожного биоптата пациентов. Предполагается, что сложности секвенирования полноразмерного гена *rrs* могут быть решены использованием видоспецифичной последовательности промотора данного гена для идентификации *M. leprae*.

Вербенко Д.А., Дерябин Д.Г., Соломка В.С., Карамова А.Э., Образцова О.А., Кубанов А.А.
Инфекционные болезни. 2022; 20(3): 67–70. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-3-67-70
Источник: <https://www.phdynasty.ru>

Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

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

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

Требования к оформлению статьи.

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

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

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:
142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
ФБУН ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org
или
bacteriology@obolensk.org

Подписку на журналы Издательства «Династия» можно оформить:

В любом почтовом отделении России по объединенному каталогу «Пресса России»

Вопросы практической педиатрии	Индекс: 87946	Инфекционные болезни	Индекс: 12919
Вопросы детской диетологии	Индекс: 12917	Вопросы диетологии	Индекс: 90955
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	Индекс: 12916	Вопросы урологии и андрологии	Индекс: 91823

Через альтернативные подписные издательства

ООО «Информнаука» – www.informnauka.com; ООО «Урал-Пресса» – www.ural-press.ru

Через сайт издательства www.phdynasty.ru для физических лиц
и через издательство для юридических лиц
с любого номера текущего года на любой период

Наименование журнала	Для физических лиц		Для юридических лиц	
	руб./полугодие	руб./год	руб./полугодие	руб./год
Вопросы практической педиатрии	1380	2760	2070	4140
Вопросы детской диетологии	1380	2760	2070	4140
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	1380	2760	2070	4140
Инфекционные болезни	920	1840	1380	2760
Вопросы диетологии	920	1840	1380	2760
Вопросы урологии и андрологии	920	1840	1380	2760

ВНИМАНИЕ!

Для выставления счета юридическим лицам достаточно прислать заявку по e-mail: podpiska@phdynasty.ru
В заявке необходимо обязательно указать реквизиты организации, название журнала, период подписки, контактный телефон, e-mail и ответственное лицо.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, тел./факс: (495) 660-6004
e-mail: podpiska@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru