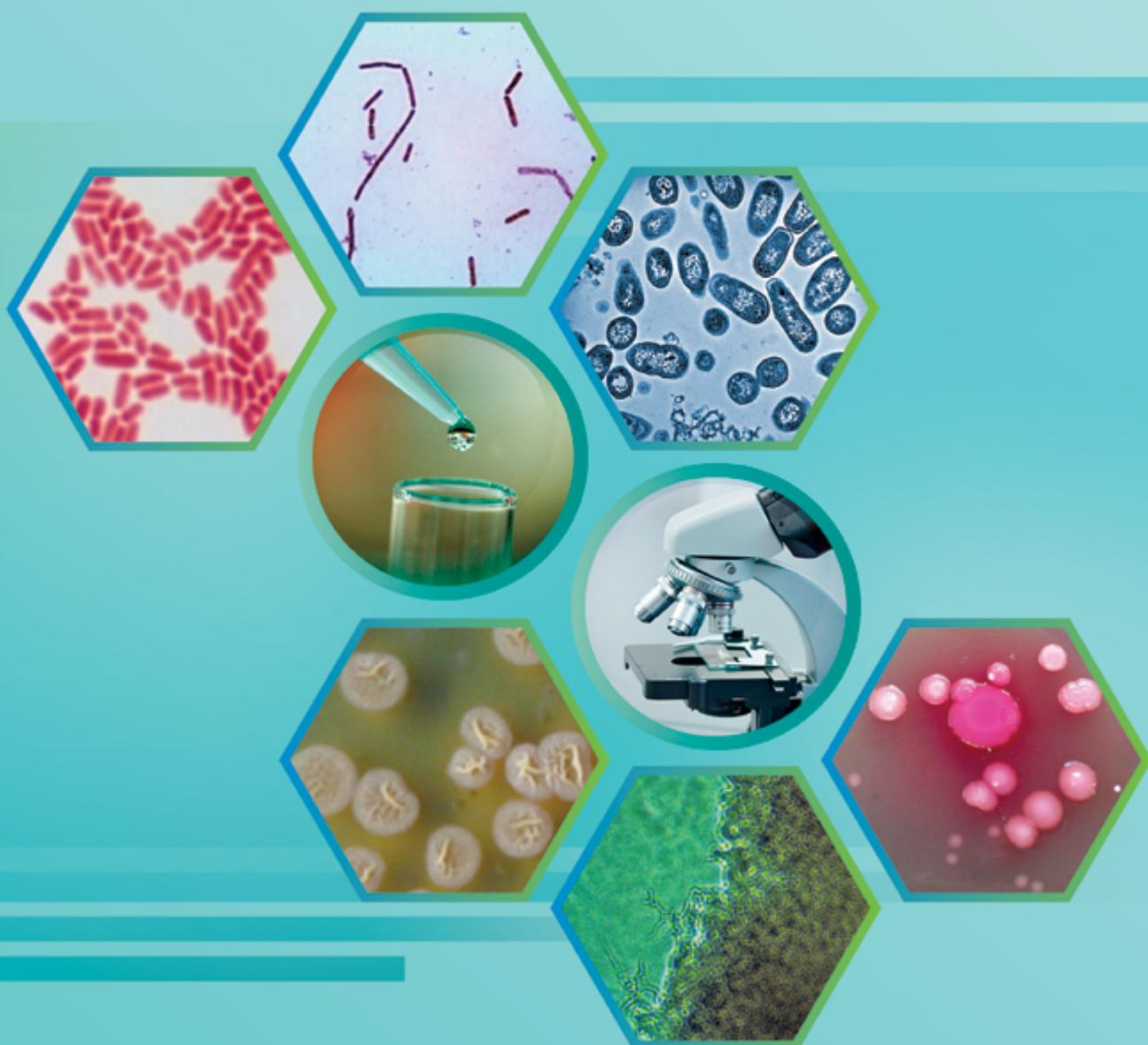


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2024 • ТОМ 9 • №2

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)	О.Е.Хохлова, д.б.н., доцент (Россия)
А.В.Карлышев, к.б.н., проф. (Великобритания)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
М.Н.Косой, к.б.н. (США)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)

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. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: +7-4967-360003
+7-4967-360046
Факс: +7-4967-360010

E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

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

Подписано в печать 28.06.2024 г.

Отпечатано: Мастерская печати Old School,
603105, Нижний Новгород, ул. Чаичной, 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 1540 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

Наиболее перспективные направления создания систем оценки токсичности объектов окружающей среды 5

Экспериментальные статьи

Влияние температуры на переход *Vibrio cholerae* O1 El Tor из биопленки в некультивируемое состояние
Е.А.Меньшикова, С.В.Титова, С.О.Водопьянов, М.Г.Мелоян, Н.А.Селянская, В.Д.Кругликов 8

Роль *Lactobacillus crispatus* в вагинальном микробном консорциуме
В.В.Ташланова, Л.В.Катаева, А.А.Вакарина, Е.В.Охотникова, К.Б.Степанова, Т.Ф.Степанова 14

Изучение гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели
А.А.Самойлова, Л.А.Краева, И.В.Лихачев, Н.В.Михайлов, Д.Д.Светлов 21

Эталонные линии штаммов *Vibrio cholerae* для производства «Вакцины холерной бивалентной химической»
О.В.Громова, О.С.Дуракова, С.А.Воробьева, А.В.Гаева, Н.И.Белякова,
Я.М.Краснов, О.А.Лобовикова, О.А.Волох 29

Разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae*
классического биовара сероваров Инаба и Огава
С.А.Воробьева, О.В.Громова, М.Н.Киреев, О.А.Волох 35

Выделение РНК из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
Н.Ю.Буданова, Д.В.Гриненко 40

Изучение возможности индукции бактериофагов у природных
и ЛПС-дефектных штаммов возбудителя туляремии и близкородственных франциселл
М.В.Цимбалистова, М.П.Погожова, А.В.Тюрина, М.Г.Мелоян, Н.В.Павлович 45

Обзорные статьи

Современные способы оценки влияния внешних факторов на физиологическое состояние
бактериальной клетки
С.В.Борисова, О.А.Волох, Л.В.Коломбет, Р.Р.Салихов 50

Молекулярно-генетические особенности *Klebsiella pneumoniae* и продукция микроцинов
М.А.Евсеева, В.А.Авдеева, И.А.Ларионова, Л.В.Коломбет, О.Е.Хохлова 58

Микробные биопленки – история изучения и современные представления
Т.Ф.Черных, О.Ю.Богданова, Ю.А.Буковская, С.Э.Ржеусский 67

Francisella tularensis subsp. *mediasiatica*: филогеография, патогенность и экология
В.В.Евсеева, И.В.Бахтеева, А.Н.Мокриевич, В.С.Тимофеев 75

Особенности бактерий рода *Blautia* – представителей микробиоты толстой кишки
Н.Н.Кукалевская, Т.А.Бажукова, Н.В.Давидович, М.А.Сабанаев 81

Правила оформления статей (основные положения) 90

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.Adyasayren, Sc.D., prof. (Mongolia)	O.E.Khokhlova Sc.D, Assoc. Prof. (Russia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)	M.N.Kosoi, PhD (USA)
M.Y.Boiro, ScD., prof. (Republic of Guinea)	I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)	S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)	T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)	V.L.Motin, PhD, prof. (USA)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)	T.V.Priputnevich, corr.member of RAS, ScD (Russia)
Sh.Gurbanov, PhD (Republic of Azerbaijan)	A.V.Rakin, PhD (Germany)
G.A.Karimova, PhD (France)	K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
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 most promising directions of creating systems for assessing the toxicity of environmental objects **5**

Experimental Articles

Influence of temperature on the transition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from biofilm to the unculturable state
E.A.Menshikova, S.V.Titova, S.O.Vodopyanov, M.G.Meloyan, N.A.Selyanskaya, V.D.Kruglikov **8**

Role of *Lactobacillus crispatus* in the vaginal microbial consortium
V.V.Tashlanova, L.V.Kataeva, A.A.Vakarina, E.V.Okhotnikova, K.B.Stepanova, T.F.Stepanova **14**

Evaluation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a biological model
A.A.Samoilova, L.A.Kraeva, I.V.Likhachev, N.V.Mikhailov, D.D.Svetlov **21**

Reference lineages of *Vibrio cholerae* strains for the production of "Chemical Bivalent Cholera Vaccine"
O.V.Gromova, O.S.Durakova, S.A.Vorobeva, A.V.Gaeva, N.I.Belyakova,
Ya.M.Krasnov, O.A.Lobovikova, O.A.Volokh **29**

Development of a method for obtaining polyclonal serums for *Vibrio cholerae* O-antigens
of the classic biotype serotype Inaba and Ogawa
S.A.Vorobeva, O.V.Gromova, M.N.Kireev, O.A.Volokh **35**

Extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*
N.Yu.Budanova, D.V.Grinenko **40**

Studying the possibility of bacteriophage induction in natural and LPS-defective
strains of tularemia and closely related francisella
M.V.Tsimbalistova, M.P.Pogozhova, A.V.Tyurina, M.G.Meloyan, N.V.Pavlovich **45**

Review Articles

Modern methods for assessing the influence of external factors on the physiological state of a bacterial cell
S.V.Borisova, O.A.Volokh, L.V.Colombet, R.R.Salikhov **50**

Molecular genetic features of *Klebsiella pneumoniae* and production of microcins
M.A.Evseeva, V.A.Avdeeva, I.A.Larionova, L.V.Colombet, O.E.Khokhlova **58**

Microbial biofilms – history of study and modern implications
T.F.Chernykh, O.Yu.Bogdanova, Yu.A.Bukovskaya, S.E.Rzheussky **67**

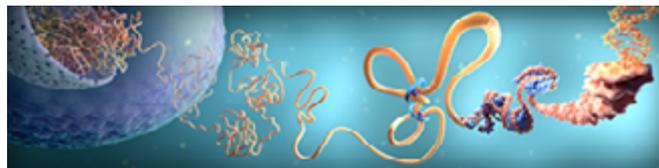
Francisella tularensis subsp. *mediasiatica*: phylogeography, pathogenicity and ecology
V.V.Evseeva, I.V.Bakhteeva, A.N.Mokrievich, V.S.Timofeev **75**

Features of bacteria of the genus *Blautia* – representatives of the microbiota of the colon
N.N.Kukalevskaya, T.A.Bazhukova, N.V.Davidovich, M.A.Sabanaev **81**

Instructions for Authors **90**

Наиболее перспективные направления создания систем оценки токсичности объектов окружающей среды

Токсины особо опасных патогенов и родственные по биологическому воздействию субстанции в общем виде нами описаны в предыдущем номере журнала. Здесь мы обратимся к некоторым другим методам оценки токсичности, комбинации которых могут быть использованы для интегральной оценки токсичности воды, воздуха, почвы и пищевых продуктов. К таким методам следует отнести: определение токсичности проб на первичных и перевиваемых культурах клеток, оценку влияния токсинов на процесс дифференцировки промиелоидных клеточных линий, оценку иммуотропного действия проб, возможности комплексного применения методов биотестирования и биоиндикации, биолюминесцентный бактериальный тест, биолюминесцентную АТФ-метрию, биотестирование с использованием ракообразных, микроводорослей и высших растений.



В данном сообщении использован большой массив опубликованных материалов по детекции токсинов, имеющийся в доступе, и сделаны выводы о наиболее рациональных направлениях исследований в данной области для создания систем выявления общей токсичности объектов окружающей среды.

Для определения токсичности проб на первичных и перевиваемых культурах клеток с целью предварительной оценки воздействия проб на живые организмы широкое распространение получили исследования, выполненные на культурах тканей. Эти модельные эксперименты имеют очевидные преимущества: относительная дешевизна по трудозатратам и материалам в отличие от экспериментов на животных, возможность разработки экспресс-методов оценки воздействия исследуемых материалов на живые объекты, проведение скрининговых опытов, достижение условий максимальной стандартизации экспериментов, расширение спектра исследований, так как позволяют на клетках одного и того же животного выполнить эксперименты, сравнивая действие разных препаратов в разных концентрациях, что невозможно в экспериментах на животных. Данные, полученные *in vitro*, относительно упрощают и оптимизируют выбор условий для экспериментов на животных.

Как пример исследования оценки влияния токсинов на процесс дифференцировки промиелоидных клеточных линий приводим схему следующего эксперимента. Человеческие промиелоидные клетки THP-1 и U937 выращивают на питательной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), дополненной 2 мМ L-глутамин, бикарбонатом натрия и 10% фетальной сыворотки теленка (Gibco, США). Дифференцировку в макрофаги индуцируют добавлением форболмиристилацетата (ФМА). Клетки U937 в плотности $5 \cdot 10^5$ кл/мл вносят в лунки 96-луночного культурального планшета (Costar, США), добавляют «шахматным» титрованием различные дозы ФМА (от 0 до 10 нг/мл) и исследуемые препараты в различных концентрациях, затем инкубируют 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Контролем служат лунки, в которые добавляют эквивалентные количества ФМА без исследуемых препаратов. По истечении срока инкубации количество прикрепленных клеток определяют в тесте МТТ.

Оценивая возможности комплексного применения методов биотестирования и биоиндикации, следует высказать несколько соображений.

Подходя к проблеме выявления токсинов с экологических позиций, следует определить термин «биоиндикация» как обнаружение и определение биологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ, что в полной мере относится и ко всем видам антропогенного загрязнения.

Детекция содержания ксенобиотиков в почве, поверхностных водах, воздухе, пище не позволяет полностью оценить уровень загрязнения окружающей среды, опасный для здоровья человека. Это связано с тем, что содержание того или иного ксенобиотика отличается от того количества, которое попадает в организм человека, из-за различной миграционной способности, биологической активности, усвояемости соединения и различия в формах его нахождения в организме и в разных средах.

Биологические системы, применение которых возможно для выявления вредных антропогенных веществ, весьма разнообразны. В настоящее время их подразделяют на шесть подгрупп в соответствии с основными биологическими дисциплинами: микроорганизмы, растения, простейшие организмы, клеточные и субклеточные элементы, различные гидробионты.

Преимущество живых индикаторов состоит в том, что они: суммируют все без исключения биологически важные данные об окружающей среде и отражают ее состояние в целом, ибо воздействие токсических веществ является толчком к разнообразным изменениям внутри экосистемы, компоненты которой тесно связаны между собой; во многих случаях делают необязательным применение дорогостоящих трудоемких физических и химических методов для измерения биологических параметров; постоянно присутствуют в окружающей человека среде и реагируют на кратковременные и залповые выбросы токсикантов, которые может не зарегистрировать автоматизированная система контроля с периодическим отбором проб на анализы; отражают скорость происходящих в природной среде изменений; указывают пути и места скопления различного рода загрязнений в экологических системах и возможные пути попадания этих агентов в пищу человека; позволяют судить о степени вредности тех или иных веществ для живой природы и человека; дают возможность контролировать действие многих синтезируемых человеком соединений; помогают нормировать допустимую нагрузку на экосистемы, различающиеся по своей устойчивости к антропогенному воздействию, так как одинаковый состав и объем загрязнений может привести к различным реакциям природных систем в разных географических зонах.

Индикаторами могут быть любые биологические объекты на всех уровнях организации (от субклеточного до экосистемного), поэтому задачи биоиндикации во многом совпадают с задачами экотоксикологии.

Для оценки состояния окружающей среды целесообразно использовать метод комплексной биоиндикации. Он заключается в комбинации фито- и зооиндикаторов на разных системных уровнях. Это позволяет оценить состояние экосистемы с точки зрения взаимодействия природных элементов экосистем и антропогенного воздействия, выявить степень устойчивости и реакцию экосистем на воздействие человека.

Использование физиологических индикаторных признаков (биоиндикаторов) позволяет определить изменения в экосистемах на очень ранних стадиях, когда они еще не проявляются морфологическими и структурными изменениями и их нельзя выявить другими методами. Это дает возможность предвидеть нарушения экосистем и вовремя принимать меры.

Изучение состояния биоиндикаторов можно использовать как дополнительную информацию при оценке здоровья населения. Для этого целесообразно использовать именно физиологические индикаторные признаки, так как существует корреляция между физиологическими реакциями животных и человека.

В качестве биологических индикаторов могут быть как растения, так и животные. Ряд групп животных, особенно млекопитающих, очень близки к человеку по морфологическим показателям, и по реакциям таких животных можно обоснованно судить, каково будет состояние человека в таких же экологических условиях обитания.

Методами биотестирования выявляется токсичность, которая является интегральным показателем загрязнения природных сред. Как и все интегральные показатели, они имеют тот недостаток, что не раскрывают индивидуальные загрязняющие вещества, присутствующие в пробе. Однако это не мешает в дальнейшем дифференцировать токсические продукты в пробе, учитывая, что, например, для большинства биотоксинов такие методы хорошо разработаны.

В настоящее время разработано большое количество методов биотестирования, основанных на исследовании реакций на токсичное воздействие отдельных «индикаторных» тест-объектов – гидробионтов, таких как простейшие (инфузории, жгутиконосцы), кишечнополостные (гидры), черви (планарии, пиявки), моллюски (пластинчатожаберные, брюхоногие), ракообразные (дафнии, гаммарусы), рыбы, представители различных групп растений, а также микроорганизмы. Все методы биотестирования основаны на регистрации выживаемости, плодовитости, скорости роста или реакций, связанных с изменением клеточных функций (энергетические показатели, передача возбуждений, био- и хемилюминесценция, движение). Наиболее часто измеряются параметры трех типов реакций – реакций фотосинтеза, реакций био- и хемилюминесценции и поведенческие реакции. В последние годы часто для целей биотестирования применяются биохимические показатели, например активность ферментов.

Широко используются в качестве тест-организмов различные виды ветвистоусых рачков дафний (*Daphnia magna*, *Daphnia longi spina*, *Ceriodaphnia dubia* и др). Биотесты с использованием дафний основаны на оценке изменений определенного набора таких форм поведения, как кувыркание, скручивание, равномерное распределение в заданном объеме, или физиологического состояния (изменения дыхательных ритмов, сердцебиения, окраски тела, абортация зародышей и т.д.), двигательной активности (изменения частоты движения) либо выживаемости и плодовитости при помещении в тестируемую воду. Токсичность воды определяется по достоверному изменению по сравнению с контролем одного-двух регистрируемых параметров.

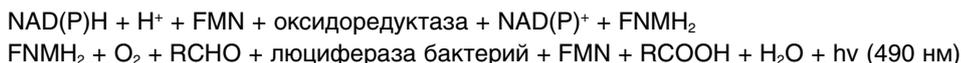
В настоящее время тесты с дафниями наиболее распространены, что обусловлено простотой культивирования этих рачков и сравнительной непродолжительностью тестирования. В странах Евросоюза принят стандарт на биотестирование сточных вод и определение токсичности отдельных химических веществ с помощью *D. magna*. По существу, это метод сводится к установлению LD₅₀ в течение 48 и 24 ч (средняя смертельная доза компонента в миллиграммах действующего вещества, вызывающая гибель 50% подопытных животных) тестируемого вещества для данного вида дафний.

Таким образом, к настоящему времени разработан довольно широкий круг биологических тестов, используемых для анализа токсичности вод и почв, хотя в методическом отношении наиболее разработаны анализы токсичности водных сред.

Учитывая необходимость разработки универсального теста определения общей токсичности сред, следует более внимательно отнестись к использованию и развитию метода под названием «Биолюминесцентный бактериальный тест».

Биолюминесценция – свечение живых организмов (светляков, фотобактерий, земляного червя *Diplocardia*, некоторых кишечнорастворимых) как следствие окисления субстрата (люциферина) под действием фермента (люциферазы). Превращения субстратов люциферазной реакции приводят к образованию промежуточного электронно-возбужденного фермент-субстратного комплекса.

Люциферины и люциферазы из разных организмов сильно различаются по структуре и химическому механизму образования возбужденного продукта. В светящихся бактериях фермент люцифераза катализирует окисление молекулярным кислородом восстановленного флавина (FMNH₂) и длинноцепочечного альдегида (RCHO) в окисленный флавин (FMN) и в соответствующую длинноцепочечную жирную кислоту (RCOOH):



Реакция сопровождается интенсивной световой эмиссией в видимой сине-зеленой области с широкой полосой спектра с максимумом 490–495 нм.

Интенсивность свечения зависит от изменений факторов внешней среды, таких как ее химический состав, температура, pH и других. Наличие в среде для фотобактерий разнообразных ксенобиотиков снижает уровень биолюминесценции пропорционально токсичности вещества. Наиболее эффективно ингибируют биолюминесценцию акцепторы электронов и ингибиторы дегидрогеназ. Установлено наличие гидрофобного участка в составе люциферазы для связывания неполярных соединений, что играет существенную роль в мониторинге токсичности гидрофобных ксенобиотиков.

Используют различные детекторы и методы регистрации свечения, например спектрофотометры и флуориметры с выключенными источниками света. Нашли применение также сцинтилляционные счетчики и спектрометры, установки типа «остановленная струя». Наиболее чувствительными и удобными для регистрации биолюминесценции являются фотоэлектронные умножители, когда фотон, попадая на катод фотоэлектронного умножителя, выбивает из него электрон. Возникающий фототок пропорционален количеству фотонов, испускаемых в единицу времени. Фотоэлектронные умножители могут также работать в режиме счетчика квантов. Для измерения достаточно низких уровней интенсивности люминесценции фотоэлектронный умножитель должен иметь хорошую спектральную чувствительность в видимой и близкой ультрафиолетовой области, где в основном излучают люминесцентные системы бактерий, а также высокое соотношение сигнал-шум. Выпускаемые в настоящее время разнообразные установки для регистрации биолюминесценции (биолюминометры) имеют общую блок-схему, однако различаются системами ввода образца, регистрации и обработки получаемых сигналов.

Описанный биолюминесцентный метод оценки токсичности удовлетворяет основным требованиям, предъявляемым к биотестам, и, кроме того, дает количественную меру токсичности и превосходит известные биотесты по быстроте действия, точности и чувствительности. Метод характеризуется также безвредностью, простотой в использовании, доступностью и экономичностью.

В бактериальных биолюминесцентных анализах можно использовать как интактные люминесцентные бактерии (*in vivo*), так и выделенные из них ферментные системы (*in vitro*). Неспецифическая чувствительность, выявляемая взаимосвязью между тушением биолюминесценции и концентрацией различных ксенобиотиков, дает возможность проводить первичную оценку их интегральной токсичности. Фирмой Microbics Operations Beckman Instruments, Inc. был разработан тест-реагент на основе лиофильно высушенных морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* (в настоящее время *Vibrio fischeri*), получивший торговую марку Microtox и сертифицированный в быстрой токсикологии в ряде стран под другими торговыми марками. В России разработаны биосенсоры, получившие фирменный знак «Эколюм». Биотестами «Эколюм» являются как морские светящиеся бактерии, так и сконструированные генно-инженерные штаммы. Аналитическая система обладает большими преимуществами перед другими сенсорами на основе люминесцентных бактерий, позволяя проводить анализ и при более высоких температурах.

Таким образом, наиболее перспективным направлением в анализе объектов окружающей среды на наличие токсичных для человека веществ является разработка и широкое внедрение комплекса методов оценки интегральной токсичности на основе трех основных подходов: использование клеточных культур, использование тест-организмов как биологических индикаторов и применение метода биолюминесценции с тест-бактериями, полученными генно-инженерными методами для тестирования различных групп веществ.

*Главный редактор журнала «Бактериология»,
директор «Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии»,
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор И.А. Дятлов*

Влияние температуры на переход *Vibrio cholerae* O1 El Tor из биопленки в некультивируемое состояние

Е.А.Меньшикова, С.В.Титова, С.О.Водопьянов, М.Г.Мелоян, Н.А.Селянская, В.Д.Кругликов

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

В настоящее время имеются многочисленные сведения о переходе в некультивируемое состояние *Vibrio cholerae*, находящихся в планктонной форме.

Целью работы явилось изучение влияния одного из абиотических факторов (температуры культивирования) на переход *V. cholerae* O1 El Tor в некультивируемое состояние из биопленочной формы этих микроорганизмов в эксперименте.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы, выделенные в разные годы из воды поверхностных водоемов: *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* и *ctxA tcpA*. Способность холерных вибрионов формировать биопленку изучали, используя в качестве биотического субстрата хитин широкопалого речного рака *Astacus astacus*.

Результаты. Для изучения возможно персистенции холерных вибрионов в поверхностных водоемах в случае заноса с эндемичных территорий опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды в летний и осенне-зимний периоды в г. Ростове-на-Дону ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ и $6 \pm 1^\circ\text{C}$). Экспериментально показано, что, независимо от гена *ctx*, холерные вибрионы в состоянии зрелой биопленки в условиях, моделирующих среднюю температуру в зимний период, способны переходить в некультивируемые формы и сохранять жизнеспособность в течение длительного времени, в то время как в контрольных пробах (планктонная форма) жизнеспособных микроорганизмов не обнаружено.

Ключевые слова: холерные вибрионы, биопленка, планктон, некультивируемые формы, температура

Для цитирования: Меньшикова Е.А., Титова С.В., Водопьянов С.О., Мелоян М.Г., Селянская Н.А., Кругликов В.Д. Влияние температуры на переход *Vibrio cholerae* O1 El Tor из биопленки в некультивируемое состояние. Бактериология. 2024; 9(2): 8–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-8-13

Influence of temperature on the transition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from biofilm to the unculturable state

E.A.Menshikova, S.V.Titova, S.O.Vodopyanov, M.G.Meloyan, N.A.Selyanskaya, V.D.Kruglikov

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

Currently, there is numerous information about the transition of *Vibrio cholerae*, which are in planktonic form, to an uncultivated state.

The purpose of the work was to study the influence of one of the abiotic factors (cultivation temperature) on the transition of *V. cholerae* O1 El Tor to the uncultivable state from the biofilm form of these microorganisms in an experiment.

Materials and methods. The work used strains isolated in different years from the water of surface reservoirs: *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* and *ctxA tcpA*. The ability of *V. cholerae* to form a biofilm was studied using chitin from the broad-toed crayfish *Astacus astacus* as a biotic substrate.

Results. To study the possible persistence of cholera vibrios in surface reservoirs in case of drift from endemic territories, experimental and control samples were cultured at a temperature corresponding to environmental conditions in summer and autumn-winter periods in Rostov-on-Don ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $6 \pm 10^\circ\text{C}$). It has been experimentally shown that, regardless of the *ctx* gene, cholera vibrios in a mature biofilm state under conditions simulating average temperature in winter are able to transition into uncultivated forms and remain viable for a long time, while no viable microorganisms were found in control samples (planktonic form).

Key words: cholera vibrios, biofilm, plankton, uncultivable forms, temperature.

For citation: Menshikova E.A., Titova S.V., Vodopyanov S.O., Meloyan M.G., Selyanskaya N.A., Kruglikov V.D. Influence of temperature on the transition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from biofilm to the unculturable state. Bacteriology. 2024; 9(2): 8–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-8-13

Для корреспонденции:

Меньшикова Елена Аркадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

Телефон: (863) 240-9108

E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

Статья поступила 22.05.2024, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Elena A. Menshikova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-9108

E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

The article was received 22.05.2024, accepted for publication 28.06.2024

Холерные вибрионы обладают высокой пластичностью генома и рядом приспособительных реакций, которые позволяют им адаптироваться и сохраняться в окружающей среде, переживать стрессовые факторы, такие как недостаток питательных веществ, колебания солености воды и температуры, защищаться от хищных гетеротрофных протистов и бактериофагов [1–3]. Одна из стратегий выживания холерных вибрионов – это формирование биопленки, что ассоциируется с повышенной стрессоустойчивостью, расширением доступа к питательным веществам [4]. Самым распространенным в окружающей среде и наиболее экологически важным субстратом является хитин. Формирование биопленки холерными вибрионами на хитиновых субстратах ведет к появлению новых экологических ниш для сохранения и переноса возбудителя в новые регионы с вероятностью возникновения новых очагов холеры [1, 5]. M.Sultana et al. (2018), исследуя поверхностные водоемы, пришли к выводу, что биопленки являются средством персистенции и неотъемлемой частью годового жизненного цикла *Vibrio cholerae* в водоемах Бангладеш. Проводя мониторинг поверхностных водоемов в течение года, было установлено, что в весенне-летний период холерные вибрионы находятся в планктонной форме и это совпадает с ежегодными сезонными вспышками холеры в этом регионе. В межэпидемический период холерные вибрионы сохраняются в форме биопленки, прикрепленные к планктону или другим субстратам, а также в некультивируемой форме (НФ) [6]. Феномен некультивируемости приобрел широкую известность благодаря работам R.R.Colwell et al. (1981), когда в пробах воды из Чесапикского залива и эстуариев были обнаружены не выявлявшиеся бактериологически *V. cholerae*. Позже, при обнаружении их на поверхности ракообразных и водорослей в планктоне и бентосе, присоединенными к кладке яиц хирономид, а также взвешенными в бактериопланктоне, было высказано мнение о значимости этой формы холерных вибрионов в выживании возбудителя холеры в окружающей среде [7]. Ряд авторов после многочисленных экспериментов по дифференциации вегетативных клеток микроорганизмов и НФ установили, что в отличие от клеток, испытывающих необходимость в каком-либо компоненте среды, в некультивируемом состоянии клетки не растут на искусственных питательных средах, в электронном микроскопе НФ холерных вибрионов имеют меньшие размеры, округлую форму, утрачивают жгутик, но остаются метаболически активными [8–12].

Следует отметить, что НФ холерных вибрионов сохраняют вирулентность и способность к колонизации [10]. Существует множество условий, которые вызывают переход холерных вибрионов в НФ, однако имеются факторы, благодаря которым происходит полное восстановление функции роста, например, повышение температуры или увеличение количества питательных веществ в среде обитания [13]. Вместе с тем остается актуальным вопрос о переходе холерных вибрионов из биопленки, сформированной на «природном» хитине, в некультивируемое состояние, поскольку все сведения о НФ в основном касаются исключительно планктонной формы.

Целью работы явилось изучение в эксперименте влияния температуры культивирования на переход *V. cholerae* O1 El Tor в некультивируемое состояние из биопленочной формы.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы, выделенные в разные годы из воды поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону: *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* P-19613 (река Темерник, 2014 г.) и *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* P-20000 (река Дон, 2016 г.).

Способность холерных вибрионов формировать биопленку изучали запатентованным способом, используя в качестве биотического субстрата хитин широкопалого речного рака *Astacus astacus* [14]. Фрагменты хитинового панциря речного рака помещали во флаконы с 30,0 мл речной воды и автоклавировали при 132°C 30 мин. Исследуемые штаммы добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 104 м.к./мл. В качестве контролей служили эти же штаммы в тех же условиях, но без биотического субстрата в среде культивирования.

Мониторинг данных температуры поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону за 5 лет (2018–2022 гг.) проводили, используя информацию с сайта <https://pogoda1.ru/water/rekadon2022>. Анализ динамики температуры в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону за 5 лет (2018–2022 гг.) показал, что значение среднемесячной температуры в зимний период составляет $6,4 \pm 0,39^\circ\text{C}$, в летний – $25,6 \pm 0,35^\circ\text{C}$ [15].

Для изучения возможной персистенции холерных вибрионов в поверхностных водоемах в случае заноса с эндемичных территорий опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды в летний и осенне-зимний периоды в г. Ростове-на-Дону ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ и $6 \pm 1^\circ\text{C}$).

Детекцию и количественный учет жизнеспособных холерных вибрионов, находящихся в биопленке, планктоне и НФ, проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [16]. Полученные значения заносили в электронные таблицы Microsoft Office Excel 2016, используя десятичный логарифм.

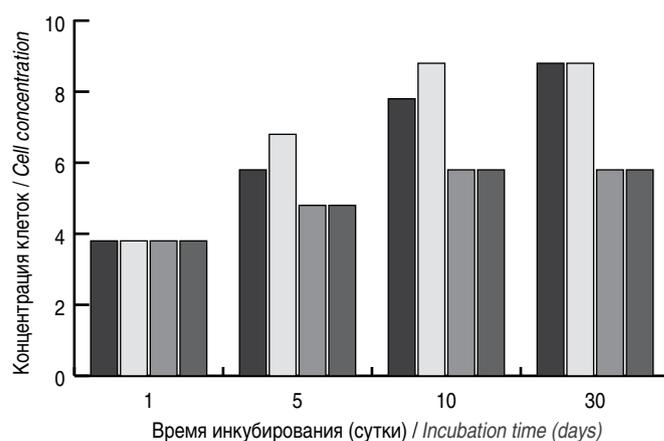


Рис. 1. Концентрация клеток штаммов *V. cholerae* O1 в планктонной форме и биопленке ($25 \pm 1^\circ\text{C}$): ■ – биопленка *V. cholerae* 19613, ■ – биопленка *V. cholerae* 20000, ■ – контроль *V. cholerae* 19613, ■ – контроль *V. cholerae* 20000. По оси ординат – концентрация клеток в lg (м.к./мл).

Fig. 1. Cell concentration of *V. cholerae* O1 strains in planktonic form and biofilm ($25 \pm 1^\circ\text{C}$): ■ – biofilm of *V. cholerae* 19613, ■ – biofilm of *V. cholerae* 20000, ■ – control *V. cholerae* 19613, ■ – control *V. cholerae* 20000. The ordinate is the cell concentration in lg (m.c/ml).

Для визуализации биопленок и НФ холерных вибрионов использовали трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ), выбирая оптимальное увеличение в зависимости от структуры объекта исследования. Препараты для ТЭМ готовили в соответствии с патентом «Способ получения образцов биопленок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии» [17].

Параллельно результаты экспериментов подтверждали бактериологическим методом, отпечатывая фрагменты хитинового панциря с биопленкой на поверхности питательной среды (агар Мартена, рН 7,6) [18, 19].

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистический анализ проводили с использованием программы Medstatistica. Полученные данные объединяли в вариационные ряды на основании которых поводили расчет среднеарифметических величин (M). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (σ). Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью t -критерия Стьюдента ($t_{Ст}$), при уровне $p \leq 0,05$ достоверности считали значимой.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследуемые пробы холерных вибрионов культивировали в условиях, моделирующих летнюю температуру воды ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), в течение 30 суток. К 5-м суткам инкубации количество клеток холерных вибрионов в биопленке нетоксигенного штамма и токсигенного составляло $\lg 6$ и 7 , т.е. примерно $3 \cdot 10^6$ и $6,6 \cdot 10^7$ м.к./мл, соответственно. На 10-е сутки концентрация холерных вибрионов увеличилась на 1-2 порядка и составила $\lg 8$ и 9 соответственно (10^8 – 10^9 м.к./мл), оставаясь на этом высоком уровне весь период наблюдения. В контрольных пробах к этому времени концентрация холерных вибрионов, независимо от наличия гена *ctxA*, составляла $\lg 6$ ($1 \cdot 10^6$ м.к./мл) и не менялась в течение месяца (рис. 1).

На 30-е сутки инкубации количество клеток холерных вибрионов в биопленках и контрольных пробах достоверно различалось ($t_{Ст} = 4,24$, $p = 0,008198$) Концентрация в ПЦР-РВ контрольных штаммов составляла $\lg 6$ (10^6 м.к./мл), опытных – $\lg 8$ ($\geq 10^8$ м.к./мл). Жизнеспособность холерных вибрионов в опытных и контрольных пробах подтверждали типичным ростом культуры на пластинах агара Мартена.

Для изучения влияния температуры на холерные вибрионы в «зрелой биопленке» и планктоне опытные и контрольные пробы поместили в условия низких температур ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), что соответствовало среднемесячной температуре поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону в зимний период. В таких условиях исследуемые штаммы культивировали в течение 70 суток [8, 18, 19]. По окончании периода наблюдения жизнеспособность штаммов холерных вибрионов определяли бактериологическим методом, отпечатывая фрагменты хитинового панциря с биопленкой на агаре Мартена, а концентрацию – в ПЦР-РВ. На агаровой среде при высеве из контрольных и опытных проб колоний холерных вибрионов не обнаружено. По результатам исследований методом ПЦР установлено, что концентрация *V. cholerae* опытных штаммов (биопленка) составляла $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, в контрольных пробах (планктонная форма) холерных вибрионов не обнаружено.

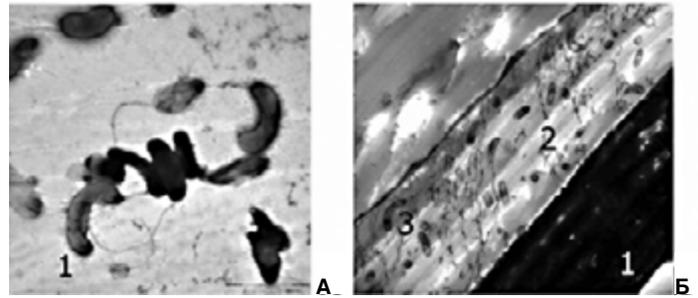


Рис. 2. *V. cholerae* O1 19613, ув. $\times 20\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: 1 – холерные вибрионы в планктонной форме (контроль). Б: биопленка *V. cholerae* 19613 на хитине, ув. $\times 10\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$); 1 – хитин, 2 – матрикс, 3 – холерные вибрионы в составе биопленки.

Fig. 2. *V. cholerae* O1 19613, magnification $\times 20,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium tetroxide (VIII) and lead citrate. A: 1 – cholera vibrios in planktonic form (control). B: biofilm of *V. cholerae* 19613 on chitin, magnification $\times 10,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$); 1 – chitin, 2 – matrix, 3 – vibrios cholerae as part of a biofilm.

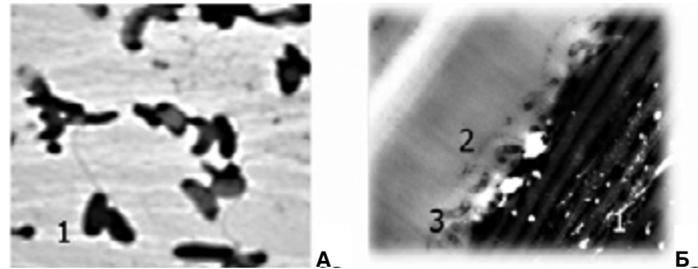


Рис. 3. *V. cholerae* O1 № 20000, ув. $\times 10\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: 1 – холерный вибрион в планктонной форме (контроль). Б: биопленка *V. cholerae* 20000 на хитине, ув. $\times 10\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – хитин, 2 – матрикс, 3 – холерные вибрионы в составе биопленки.

Fig. 3. *V. cholerae* O1 No 20000, magnification $\times 10,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate. A: 1 – *V. cholerae* in planktonic form (control). B: biofilm of *V. cholerae* 20000 on chitin, magnification $\times 10,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – chitin, 2 – matrix, 3 – cholera vibrios as part of a biofilm.

После 70 суток культивирования при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$ исследуемые пробы поместили в условия, моделирующие летний период ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), и ежедневно высевали на агаровые пластины в течение 5 суток.

На 3-й день инкубации в отпечатках фрагментов хитина на агаре Мартена, независимо от токсигенности штаммов, отмечали рост типичных по морфологии единичных колоний *V. cholerae* O1. При ежедневном высеве контрольных штаммов на агаровые пластины в течение 5 суток колоний вибрионов не обнаружено. Возможно, что холерные вибрионы в планктонной форме не способны переживать низкую температуру длительное время. Изучая переход холерных вибрионов из НФ в вегетативную стадию, S.Buerger et al. (2012), S.Zhao et al. (2022) установили, что только малая часть популяции пробуждается «от спячки» и при благоприятных условиях может расти на питательных средах, если же экологические факторы не соответствуют благоприятным условиям для размножения клеток холерных вибрионов, то, по мнению авторов, погибает лишь небольшая доля популяции. Однако, если условия благоприятны, происходит переход клеток холерных вибрионов из некультивируемого состояния в вегетативную форму [20, 21].

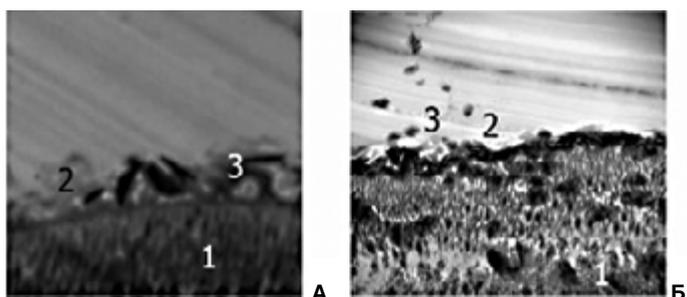


Рис. 4. Фрагменты разрушенных биопленок, ув. $\times 10\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: фрагмент разрушенной биопленки *V. cholerae* O1 20000, 1 – хитин, 2 – разрушенные клетки, 3 – фрагменты биопленки холерных вибрионов. Б: фрагмент разрушенной биопленки *V. cholerae* O1 19613, ув. $\times 10\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$), 1 – хитин, 2 – фрагмент биопленки, 3 – разрушенные клетки холерных вибрионов.

Fig. 4. Fragments of destroyed biofilms, magnification $\times 10,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium tetroxide (VIII) and lead citrate. A: fragment of destroyed biofilm of *V. cholerae* O1 20000, 1 – chitin, 2 – destroyed cells, 3 – fragments of *V. cholerae* biofilm. B: fragment of a destroyed biofilm of *V. cholerae* O1 19613, magnification $\times 10,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$), 1 – chitin, 2 – biofilm fragment, 3 – destroyed *V. cholerae* cells.

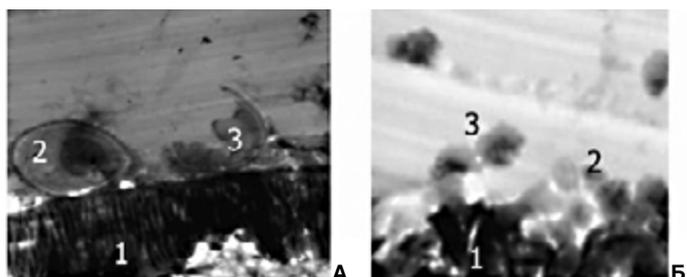


Рис. 5. Некультивируемые клетки *V. cholerae* O1. Увеличение $\times 50\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: некультивируемая клетка *V. cholerae* O1 19613. 1 – хитин, 2 – некультивируемая клетка холерного вибриона, 3 – разрушенная клетка холерного вибриона. Б: некультивируемые и разрушенные клетки *V. cholerae* O1 20000, увеличение $\times 50\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – хитин, 2 – оболочка разрушенной клетки холерного вибриона, 3 – некультивируемая клетка холерного вибриона.

Fig. 5. Uncultured *V. cholerae* O1 cells. Magnification $\times 50,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate. A: uncultivated cell of *V. cholerae* O1 19613. 1 – chitin, 2 – uncultivated cell of *V. cholerae*, 3 – destroyed cell of *V. cholerae*. B: uncultivated and destroyed *V. cholerae* O1 20000 cells, magnification $\times 50,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – chitin, 2 – shell of a destroyed *V. cholerae* cell, 3 – uncultivated *V. cholerae* cell.

Для визуализации процессов, происходящих с *ctxA+tcpA+* и *ctxA+tcpA-* холерными вибрионами в биопленке на хитиновом субстрате и в планктоне при воздействии на них различных температур, применили ТЭМ.

На микрофотографиях *V. cholerae* O1 19613 и *V. cholerae* O1 20000 видны изменения в биопленках обоих штаммов после инкубации при температуре воды в летний ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) и в зимний период ($6 \pm 1^\circ\text{C}$).

На микрофотографиях (рис. 2А, 3А) в планктонной форме клетки токсигенного и нетоксигенного штаммов холерных вибрионов имеют вид изогнутых палочек с длинным жгутиком, расположенным на одном конце тела клетки, и не от-

личаются друг от друга. При переходе клеток в биопленочную форму клетка теряет жгутик, и выстраивает биопленку благодаря выработке экзополисахарида, который создает межклеточный матрикс (рис. 2Б, 3Б). Образование биопленки на хитиновом субстрате у штаммов *V. cholerae* O1 *ctxA+tcpA+* и *ctxA+tcpA-* имеет отличия в виде структурных особенностей в толщине и плотности матрикса (рис. 2Б, 3Б).

На микрофотографиях, представленных на рис. 4 (А, Б), видны изменения в структуре биопленок при температуре культивирования $6 \pm 1^\circ\text{C}$, которая способствует переходу в некультивируемое состояние клеток, находящихся в биопленке, при этом высота межклеточного матрикса уменьшается, уже не видно мембраны, отделяющей межклеточный матрикс от среды культивирования, не просматриваются складчатые структуры внутри матрикса. Биопленки обоих штаммов имеют истонченный вид.

На рис. 4 видно, что часть клеток разрушена, на фотографиях визуализируются только их оболочки бледно-серого размытого цвета.

На микрофотографиях, представленных на рис. 5 (А, Б), видна истонченная биопленка обоих исследуемых штаммов, состоящая из мелких клеток сферической формы, утративших жгутик (некультивируемых клеток), и разрушенных клеток холерных вибрионов, содержимое которых выделяется в среду культивирования.

Заключение

Таким образом, экспериментально показано, что, независимо от наличия гена *ctx*, холерные вибрионы в состоянии зрелой биопленки в условиях, моделирующих среднюю температуру воды поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону в зимний период, способны переходить в НФ и сохраняться жизнеспособными в течение длительного времени (70 суток). В результате электронно-микроскопического исследования получены микрофотографии, на которых видны изменения в структуре биопленок, при различных температурах культивирования. Возможность перехода клеток в некультивируемое состояние обеспечивает холерным вибрионам низкий уровень гибели популяции в межэпидемический период и позволяет бактериям восстановиться при благоприятных условиях окружающей среды. Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения экологии холерных вибрионов и механизмов выживания этих микроорганизмов во внешней среде.

Источник финансирования

Работа проведена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Марков ЕЮ, Куликалова ЕС, Урбанович ЛЯ, Балахонов СВ, Вишняков ВС. Хитин и продукты его гидролиза в экологии холерного вибриона. Биохимия. 2015;80(9):1109-1116. DOI: 10.1134/S0006297915090023
2. Lutz C, Erken M, Noorian P, Sun S, McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2013 Dec 16;4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375
3. M Jayakumar J, Balasubramanian D, Reddi G, Almagro-Moreno S. Synergistic role of abiotic factors driving viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol Rep. 2020 Aug;12(4):454-465. DOI: 10.1111/1758-2229.12861
4. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. Vaccine. 2020 Feb 29;38 Suppl 1:A83-A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
5. Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Водопьянов СО, Писанов РВ, Титова СВ. Оценка способности холерных вибрионов формировать биопленку на поверхности хитинового панциря речного рака. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021;98(4):434-439. DOI: 10.36233/0372-9311-99
6. Sultana M, Nusrin S, Hasan NA, Sadique A, Ahmed KU, Islam A, et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal Estuary. mBio. 2018 Apr 17;9(2):e00483-18. DOI: 10.1128/mBio.00483-18
7. Colwell RR, Seidler RJ, Kaper J, Joseph SW, Garges S, Lockman H, et al. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. Appl Environ Microbiol. 1981 Feb;41(2):555-8. DOI: 10.1128/aem.41.2.555-558.1981
8. Соколенко АВ, Миронов АЮ. Некультивируемые формы *Vibrio cholerae* O1/O39: итоги и перспективы. Национальные приоритеты России. 2014;3(13):86-89.
9. Brenzinger S, van der Aart LT, van Wezel GP, Lacroix JM, Glatter T, Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2019 Apr 17;10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793
10. Wu B, Liang W, Kan B. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2016 Mar 30;7:404. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00404
11. Naser IB, Hoque MM, Faruque SN, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Faruque SM. *Vibrio cholerae* strains with inactivated *cqsS* gene overproduce autoinducer-2 which enhances resuscitation of dormant environmental *V. cholerae*. PLoS One. 2019 Oct 1;14(10):e0223226. DOI: 10.1371/journal.pone.0223226
12. Титова СВ, Соколенко АВ, Ломов ЮМ, Подосинникова ЛС, Меньшикова ЕА, Миронова АВ. Морфологические изменения в популяции холерных вибрионов при переходе в некультивируемое состояние под влиянием отдельных абиотических и биотических факторов в эксперименте. Проблемы особо опасных инфекций. 2004;2(88):45-49.
13. Mishra A, Taneja N, Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. J Appl Microbiol. 2012 May;112(5):945-53. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05255.x
14. Водопьянов СО, Водопьянов АС, Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Титова СВ. Способ моделирования биопленок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Патент РФ 20192685878, МПК 51 C12N 11/00. / № 2018103604.
15. Electronic resource. Available at: <https://pogoda1.ru/water/reka-don> 2022
16. Титова СВ, Меньшикова ЕА, Водопьянов СО, Олейников ИП, Бородина ТН. Изучение биопленочной формы холерных вибрионов методом ПЦР-РВ. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2022;27(1):23-32. DOI: 10.17816/EID109894
17. Головин СН, Титова СВ, Симонова ИР. Способ получения образцов биопленок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии. Патент РФ 2 662 938 МПК 51 C12N 11/14. № 201710834614.
18. Николеишвили ЛР, Подосинникова ЛС. Переход холерных вибрионов в некультивируемое состояние под влиянием некоторых абиотических факторов. Фундаментальные исследования. 2004;2:18-21.
19. Титова СВ, Кушнарева ЕВ. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода. Фундаментальные исследования. 2014;10(2):375-379.
20. Buerger S, Spoering A, Gavriš E, Leslin C, Ling L, Epstein SS. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. Appl Environ Microbiol. 2012 May;78(9):3221-8. DOI: 10.1128/AEM.07307-11
21. Zhao S, Lu X, Zhang J, Kan B. Absolute quantification of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* using droplet digital PCR with oil-enveloped bacterial cells. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0070422. DOI: 10.1128/spectrum.00704-22

References

1. Markov EYu, Kulikalova ES, Urbanovich LYa, Vishnyakov VS, Balakhonov SV. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. Biochemistry. 2015;80(9):1109-1125. DOI: 10.1134/S0006297915090023 (In Russian).
2. Lutz C, Erken M, Noorian P, Sun S, McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2013 Dec 16;4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375
3. M Jayakumar J, Balasubramanian D, Reddi G, Almagro-Moreno S. Synergistic role of abiotic factors driving viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol Rep. 2020 Aug;12(4):454-465. DOI: 10.1111/1758-2229.12861
4. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. Vaccine. 2020 Feb 29;38 Suppl 1:A83-A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
5. Menshikova EA, Kurbatova EM, Vodopyanov SO, Pisanov RV, Titova SV. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2021;98(4):434-439. DOI: 10.36233/0372-9311-99 (In Russian).
6. Sultana M, Nusrin S, Hasan NA, Sadique A, Ahmed KU, Islam A, et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal Estuary. mBio. 2018 Apr 17;9(2):e00483-18. DOI: 10.1128/mBio.00483-18
7. Colwell RR, Seidler RJ, Kaper J, Joseph SW, Garges S, Lockman H, et al. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. Appl Environ Microbiol. 1981 Feb;41(2):555-8. DOI: 10.1128/aem.41.2.555-558.1981
8. Sokolenko AV, Mironov AYu. Uncultivable forms of *Vibrio cholerae* O1/O39: summary and outlook. Natsional'nye priorityty Rossii. 2014;3(13):86-89. (In Russian).
9. Brenzinger S, van der Aart LT, van Wezel GP, Lacroix JM, Glatter T, Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2019 Apr 17;10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793
10. Wu B, Liang W, Kan B. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2016 Mar 30;7:404. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00404
11. Naser IB, Hoque MM, Faruque SN, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Faruque SM. *Vibrio cholerae* strains with inactivated *cqsS* gene overproduce autoinducer-2 which enhances resuscitation of dormant environmental *V. cholerae*. PLoS One. 2019 Oct 1;14(10):e0223226. DOI: 10.1371/journal.pone.0223226
12. Titova SV, Sokolenko AV, Lomov YuM, Podosinnikova LS, Menshikova EA, Mironova AV. Morphological changes in a cholera vibrio population during its transition into non-culturing state due to the effects of individual abiotic and biotic factors under experimental conditions. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2004;2(88):45-49. (In Russian).
13. Mishra A, Taneja N, Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but

- nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. J Appl Microbiol. 2012 May;112(5):945-53. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05255.x
14. Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Men'shikova EA, Kurbatova EM, Titova SV. Sposob modelirovaniya bioplenok, formiruemykh *Vibrio cholerae* O1 serogruppy na poverkhnosti khitina. Patent RF 20192685878, MPK 51 S12N 11/00. / № 201810360. (In Russian).
15. Electronic resource. Available at: <https://pogoda1.ru/water/reka-don> 2022
16. Titova SV, Menshikova EA, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP, Borodina TN. Study of the biofilm form of vibrio cholera by RT-PCR. Epidemiology and Infectious Diseases. 2022;27(1):23-32. DOI: 10.17816/EID109894 (In Russian).
17. Golovin SN, Titova SV, Simonova IR. Sposob polucheniya obraztsov bioplenok kholerных vibriонов dlya issledovaniya metodom transmissionnoi elektronnoi mikroskopii. Patent RF 2 662 938 MPK 51 C12N 11/14. № 201710834614. (In Russian).
18. Nicoleischvili LR, Podosinnikova LS. Influence abiotic factors on transfor *Vibrio cholerae* to nonculturable form. Fundamental Research. 2004;2:18-21. (In Russian).
19. Titova SV, Kusnaryova EV. Evaluation of *Vibrio cholerae* ability to form biofilms in vitro with the use of the new experimental procedure. Fundamental Research. 2014;10(2):375-379. (In Russian).
20. Buerger S, Spoering A, Gavrish E, Leslin C, Ling L, Epstein SS. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. Appl Environ Microbiol. 2012 May;78(9):3221-8. DOI: 10.1128/AEM.07307-11
21. Zhao S, Lu X, Zhang J, Kan B. Absolute quantification of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* using droplet digital PCR with oil-enveloped bacterial cells. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0070422. DOI: 10.1128/spectrum.00704-22

Информация о соавторах:

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Мелоян Мисак Геворгович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Селянская Надежда Александровна, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Svetlana V. Titova, PhD, MD, leading researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, chief researcher of the of the department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Misak G. Meloyan, junior researcher at the Laboratory of Natura Focal and Zoological Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Nadezhda A. Selyanskaya, senior researcher, department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, chief researcher, department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Хронические ушные инфекции связаны с длительными нарушениями работы мозга и языка у детей

Новое исследование ученых из Университета Флориды показывает, что если ушные инфекции становятся хроническими, то повторяющаяся временная потеря слуха может привести к дефициту слухового восприятия и языкового развития у детей спустя годы.

Изучили слуховую обработку информации и языковое развитие 117 детей в возрасте от 5 до 10 лет как с историей хронических ушных инфекций в раннем детстве, так и без них.

В среднем дети, перенесшие несколько ушных инфекций в возрасте до трех лет, имели меньший словарный запас и труднее подбирали схожие по звучанию слова, чем дети с небольшим количеством ушных инфекций или вообще без них. Они также с трудом распознавали изменения в звуках, что свидетельствует о проблемах в центрах слуховой обработки информации в их мозге.

Раннее лечение ушных инфекций может помочь предотвратить скопление жидкости, которое препятствует развитию речи. Если ушные инфекции случаются часто и в ухе скапливается жидкость, трубки, временно установленные в барабанной перепонке, помогут отвести жидкость и восстановить слух, что приведет к снижению риска задержки развития центральных слуховых путей и уменьшению проблем с освоением языка.



Nittrouer S, Lowenstein JH.

Early otitis media puts children at risk for later auditory and language deficits. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2024 Jan;176:111801. DOI: 10.1016/j.ijporl.2023.111801

Роль *Lactobacillus crispatus* в вагинальном микробном консорциуме

В.В.Ташланова, Л.В.Катаева, А.А.Вакарина, Е.В.Охотникова, К.Б.Степанова, Т.Ф.Степанова

ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень,
Российская Федерация

Преобладание бактерий семейства *Lactobacillaceae*, в т.ч. *Lactobacillus crispatus*, в структуре микробного вагинального сообщества считается одним из важных показателей здорового урогенитального тракта. Состояние микробиоты влагалища играет ключевую роль в поддержании физиологического статуса репродуктивного тракта, создании условий для зачатия и течения беременности, формировании кишечной микробиоты новорожденного и дальнейшего развития ребенка.

Цель исследования – оценить колонизационную резистентность бактерий *L. crispatus* на микробный консорциум отделяемого влагалища.

Материалы и методы. Изучено 447 образцов вагинального содержимого пациенток различных возрастных групп. Качественный и количественный состав консорциума бактерий влагалищного отделяемого на фоне доминирующих бактерий семейства *Lactobacillaceae* исследовали классическим бактериологическим методом. Идентификацию изолятов проводили методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS. Статистический анализ данных, полученных при проведении исследований, осуществляли в программном обеспечении SPSS Statistics v.22.

Результаты. В структуре изолятов семейства *Lactobacillaceae* влагалищного отделяемого пациенток определено статистически значимое преобладание *L. crispatus* при сравнении с частотой обнаружения *L. gasseri* и *L. jensenii*. Установлено, что количество *L. crispatus* к 57 годам у женщин снижается почти в 3 раза, на этом фоне возрастает частота обнаружения *L. gasseri*. Сравнительный анализ количества изолятов микробного сообщества выявил, что при обнаружении в микробиоме лактобацилл в целом достоверно реже идентифицировались бактерии родов *Streptococcus*, *Staphylococcus* и семейства *Enterobacteriaceae*, чем при их отсутствии. Количество бактерий *Bifidobacterium* spp. и грибов рода *Candida* достоверно выше при наличии во влагалищном консорциуме лактобацилл. Установлено статистически значимое влияние *L. crispatus* на подавление роста бактерий рода *Streptococcus* – 13,7% ($\chi^2 = 4,18$; $p = 0,04$) и семейства *Enterobacteriaceae* – 9,9% ($\chi^2 = 5,8$; $p = 0,016$). Статистически значимого снижения частоты выявления бактерий рода *Enterococcus* как на фоне присутствия лактобацилл в целом, так и *L. crispatus* не выявлено.

Ключевые слова: *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus crispatus*, репродуктивный тракт, влагалищное отделяемое, CST (community state type) – тип состояния сообщества влагалища

Для цитирования: Ташланова В.В., Катаева Л.В., Вакарина А.А., Охотникова Е.В., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф. Роль *Lactobacillus crispatus* в вагинальном микробном консорциуме. Бактериология. 2024; 9(2): 14–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-14-20

Role of *Lactobacillus crispatus* in the vaginal microbial consortium

V.V.Tashlanova, L.V.Kataeva, A.A.Vakarina, E.V.Okhotnikova, K.B.Stepanova, T.F.Stepanova

Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russian Federation

The predominance of bacteria of the *Lactobacillaceae* family, including *Lactobacillus crispatus*, in the structure of the vaginal microbial community is considered one of the important indicators of a healthy urogenital tract. The state of the vaginal microbiota plays a key role in maintaining the physiological status of the reproductive tract, creating conditions for conception and pregnancy, the formation of the intestinal microbiota of the newborn and the further development of the child.

The purpose of the study was to evaluate the colonization resistance of *L. crispatus* bacteria to the microbial consortium of vaginal discharge.

Materials and methods. 447 samples of vaginal contents from patients of various age groups were studied. The qualitative and quantitative composition of the consortium of vaginal discharge bacteria against the background of the dominant bacteria of the *Lactobacillaceae* family was studied using the classical bacteriological method. Isolates were identified by MALDI-TOF MS. Statistical analysis of the data obtained during the research was carried out in SPSS Statistics v.22 software.

Results. In the structure of isolates of the *Lactobacillaceae* family from the vaginal discharge of patients, a statistically significant predominance of *L. crispatus* was determined when compared with the frequency of detection of *L. gasseri* and *L. jensenii*. It has been established that the amount of *L. crispatus* in women by the age of 57 decreases almost threefold, against this background the frequency of detection of *L. gasseri* increases. A comparative analysis of the number of isolates of the microbial community revealed that when lactobacilli were detected in the microbiome as a whole, bacteria of the genera

Для корреспонденции:

Катаева Любовь Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Адрес: 625026, Тюмень, ул. Республики, 147

Телефон: (3452) 28-99-93, доб. 1123

E-mail: info@tniikip.rosпотребнадzor.ru

Статья поступила 23.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Lyubov V. Kataeva, MD, PhD, DSc, chief researcher, head of the bacteriological laboratory, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology

Address: 147 Respubliki str., Tyumen, 625026, Russian Federation

Phone: (3452) 28-99-93, доб. 1123

E-mail: info@tniikip.rosпотребнадzor.ru

The article was received 23.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

Streptococcus, *Staphylococcus* and the *Enterobacteriaceae* family were identified significantly less often than in their absence. The number of *Bifidobacterium* spp. and *Candida* fungi is significantly higher in the presence of lactobacilli in the vaginal consortium. A statistically significant effect of *L. crispatus* on suppressing the growth of bacteria of the genus *Streptococcus* 13.7% ($\chi^2 = 4.18$; $p = 0.04$) and the family *Enterobacteriaceae* 9.9% ($\chi^2 = 5.8$; $p = 0.016$) was established. There was no statistically significant decrease in the frequency of detection of bacteria of the genus *Enterococcus*, either against the background of the presence of lactobacilli in general or *L. crispatus*.

Key words: *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus crispatus*, urogenital tract, reproductive tract, vaginal contents, CST (community state type) – type of state of the vaginal community

For citation: Tashlanova V.V., Kataeva L.V., Vakarina A.A., Okhotnikova E.V., Stepanova K.B., Stepanova T.F. Role of *Lactobacillus crispatus* in the vaginal microbial consortium. *Bacteriology*. 2024; 9(2): 14–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-14-20

Нормальная микробиота репродуктивной системы женщин – одно из главных условий сохранения здоровья будущего поколения. Вагинальный микробиом с преобладанием бактерий семейства *Lactobacillaceae* считается одним из важных показателей состояния урогенитального тракта женщин [1–3]. В структуре бактериального консорциума слизистой влагалищного отделяемого здоровых женщин лактобактерии занимают 80–98% от общего состава [1, 4–7]. Семейство *Lactobacillaceae* принадлежит к типу *Bacillota*, классу *Bacilli*, отряду *Lactobacillales* [8, 9]. В 2020 г. на основании филогенетического анализа проведена реклассификация рода *Lactobacillus*, который был разделен на 25 отдельных родов, к ним же добавлены 23 новых [9, 10].

Среди разнообразия бактерий семейства *Lactobacillaceae*, встречающихся во влагалищной среде, доминирующими видами являются: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* [2, 6, 11], из нетипичных для этого локуса отмечены: *L. equi*, *L. mucosae*, *L. murinis* [12], *L. coleohominis* [13], *L. kunkeei* [14].

Благодаря возможности образовывать органические кислоты (молочную, лимонную, уксусную, масляную и пропионовую), перекись водорода, производить белок лизоцим и бактериоцины биосурфактанты бактерии семейства *Lactobacillaceae* препятствуют росту патогенов, а также обеспечивают антибактериальную и противовирусную активность в занимаемой нише [1, 15, 16]. Уровень защиты от инфекций может варьировать в зависимости от конкретных видов и даже штаммов *Lactobacillaceae*. Вместе с тем имеются данные о том, что не все лактобактерии проявляют колонизационную активность в отношении патогенных микроорганизмов, населяющих влагалищный биотоп [17].

Впервые в 2011 г. J.Ravel предложил новую классификацию для оценки состояния влагалищной микробиоты. Данная классификация включает 5 вагинотипов, или типов состояния сообщества влагалища (community state type/CST), базирующихся на исследовании влагалищного микробиома методом секвенирования 16S рПНК [18, 19]. В 2012 г. тип CST IV был расширен на два дополнительных подтипа микробных сообществ отделяемого влагалища – А и В [20]. Вагинотипы CST I, II, III, V характеризуются преобладанием *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensenii* соответственно [17, 18, 21–24].

По своей природе *L. crispatus* принадлежат к гомоферментативным молочнокислым бактериям, способным корректировать микробный консорциум за счет сокращения численности патогенных бактерий, связанных с вагинальными инфекциями [21, 25]. Вагинальный штамм *L. crispatus* способен посредством гликолиза образовывать пировиноградную кислоту и лактат (аэробный тип гликолиза) [14, 21]

в изоформах D и L [26]. Результаты изучения функции *L. crispatus* в микробном сообществе указывают на их роль маркера здоровой влагалищной среды, являющегося показателем благоприятного прогноза риска развития вагинальных инфекций [27].

Физиологичный бактериальный консорциум влагалища здоровых женщин репродуктивного возраста (согласно Всемирной организации здравоохранения, репродуктивный возраст определен до 49 лет) состоит из грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [28], количество их при различных состояниях женского организма может варьировать, в т.ч. на фоне преобладания лактобактерий. Несомненно, между бактериями, колонизирующими влагалищную нишу, существует взаимосвязь, и микробиом каждой женщины отличается своей уникальностью. Задачи изучения совместного взаимовлияния микробного сообщества влагалищной среды и бактерий семейства *Lactobacillaceae*, в частности *L. crispatus*, решены не окончательно.

Таким образом, несмотря на значимость *L. crispatus* в поддержании здоровой репродуктивной функции и влияние на сопутствующее микробное сообщество, данные об их роли в формировании колонизационной резистентности вагинальной микробиоты в отношении определенных бактериальных патогенов являются единичными и посвящены в основном оценке типа вагинального сообщества. В этой связи исследование функциональных способностей *L. crispatus* представляет особый интерес в гинекологической практике.

Цель исследования: оценить влияние *L. crispatus* на колонизационную резистентность бактериального консорциума влагалища.

Материалы и методы

Проведено бактериологическое исследование влагалищного отделяемого 447 пациенток гинекологического кабинета поликлиники с жалобами на дискомфорт во влагалище (зуд, жжение), патологические выделения различного характера, проблемы с мочеиспусканием. Обратившиеся женщины в возрасте от 0 до 72 лет были разделены по возрастам: 0–17 лет; 18–45 лет; 46–55 лет и 56–72 года. Мазок со слизистой заднего свода влагалища отбирали одноразовым стерильным тампоном с транспортной средой, суспендировали и титровали в серийных разведениях стерильного физиологического раствора. Посев осуществляли классическим бактериологическим методом на питательные среды коммерческого производства (элективные, дифференциально-диагностические): лактобакагар (при инкубации посев биоматериала при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение

24–48 ч), агар Эндо-ГПМ, желточно-солевой агар, среда тиогликолевая, среда Блаурокка, агар Сабуро в аэробных условиях инкубирования при 37°C в течение 24–48 ч. Идентификация изолятов выполнялась методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Достоверной считалась идентификация с показателем Score >2,000.

Статистический анализ данных, полученных при проведении исследований, осуществляли в программном обеспечении SPSS Statistics v.22. При оценке непараметрических величин в зависимости от количества изолятов рассчитывали критерий χ^2 Пирсона и Фишера (различия считались достоверно значимыми при $p < 0,05$). Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей с указанием 95%-х доверительных интервалов (ДИ) – метод Клоппера–Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

Структура выделенных изолятов ($n = 1289$) консорциума влагалищного содержимого всех обследованных пациенток представлена следующими микроорганизмами. На лактобактерии пришлось 354 (27,5% [95% ДИ: 25,04–29,99]) изолятов, на бактерии рода *Bifidobacterium* – 282 (21,9% [95% ДИ: 19,65–24,24]). Количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae* составило 93 (7,2% [95% ДИ: 5,86–8,77]) изолята. Среди грамположительных кокков к роду *Staphylococcus* отнесено 177 (13,7% [95% ДИ: 11,9–15,73]) изолятов, к *Streptococcus* spp. – 116 (9,0% [95% ДИ: 7,49–10,7]), *Enterococcus* spp. – 102 изолята (7,9% [95% ДИ: 6,5–9,52]). Грибы рода *Candida* составили 107 (8,3% [95% ДИ: 6,85–9,94]) изолятов. В группу прочих вошли 58 (4,5% [95% ДИ: 3,43–5,78]) изолятов, среди которых идентифицированы: *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp., *Saccharomyces* spp., *Actinomyces* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Granulicatella ellegans*, *Bacillus cereus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pediococcus acidilactia*, *Achromobacter* spp.

У пациенток активного репродуктивного возраста регистрировался более разнообразный полимикробный вагинальный микробиом (72,5% от общего количества изолятов, в т.ч. на лактобациллы пришлось 21,2%). Консорциум микробиоты пациенток в период постменопаузы отличался скудным видовым разнообразием, доля всех изолятов составила 19,63%, в т.ч. лактобацилл – 5,4%.

Бактерии семейства *Lactobacillaceae* были обнаружены и идентифицированы у 300 (67,1% [95% ДИ: 62,54–71,46]) пациенток в возрасте от 0 до 66 лет, средний возраст которых составил 35 лет (Q1-Q3: 28–44). В структуре бактерий семейства *Lactobacillaceae*, выделенных из влагалищного отделяемого пациенток, преобладают *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* (рис. 1). С учетом 95% ДИ *L. crispatus* и *L. gasseri* идентифицировались достоверно чаще. Вместе с тем определено статистически достоверно значимое преобладание *L. crispatus* по сравнению с частотой обнаружения *L. gasseri* и *L. jensenii* (*L. crispatus* и *L. gasseri* – $\chi^2 = 27,742$, $p = 0,001$; *L. crispatus* и *L. jensenii* – $\chi^2 = 81,674$, $p = 0,001$). Указанные различия регистрировались преимущественно за счет пациенток в возрасте 18–45 лет (*L. crispatus* и *L. gasseri* – $\chi^2 = 29,740$, $p = 0,001$; *L. crispatus* и *L. jensenii* – $\chi^2 = 65,841$,

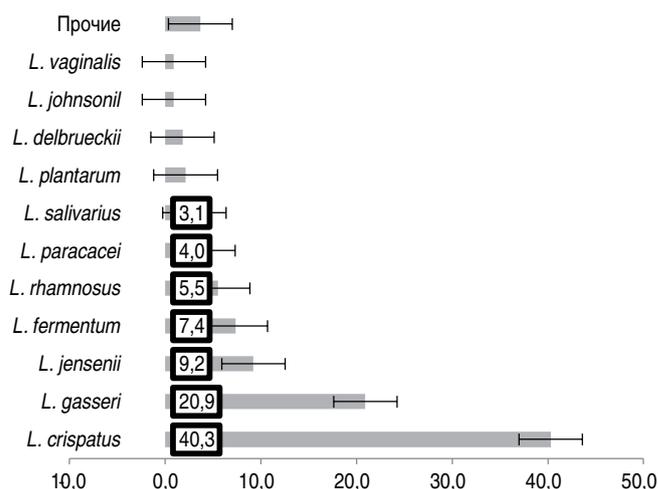


Рис. 1. Частота обнаружения идентифицированных видов семейства *Lactobacillaceae* в отделяемом влагалища пациенток, %.
 Fig. 1. Frequency of detection of identified species of the family *Lactobacillaceae* in the vaginal discharge of patients, %.

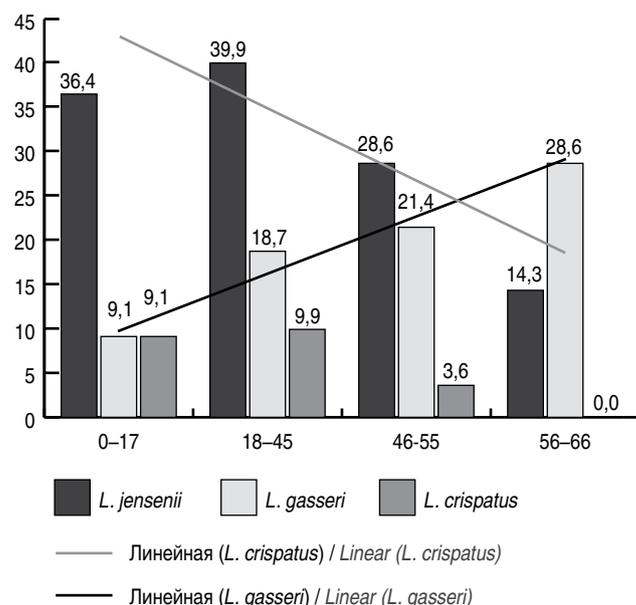


Рис. 2. Частота обнаружения *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* в отделяемом влагалища пациенток различных возрастных групп, %.
 Fig. 2. Frequency of detection of *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* in the vaginal discharge of patients of different age groups, %.

$p = 0,001$). Статистически значимое преобладание *L. crispatus* также отмечено в сравнении с *L. jensenii* у пациенток в возрастных группах 18–55 лет ($\chi^2 = 12,974$, $p = 0,001$).

Такие виды, как *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii* и *L. vaginalis*, обнаруживались менее чем в 3,0% случаев. В группе прочих видов идентифицировались *L. amylovorus*, *Lactilactobacillus fuchuensis*, *L. jakei*, *Liquorilactobacillus nagelii*, *L. acidophilus*, *L. garviacea*, *Ligilactobacillus murinus*, *L. oris*, *L. agilis*, *L. saerimneri*.

Изоляты *L. crispatus* обнаружены у 131 (43,7% [95% ДИ: 37,97–49,48]) пациентки. В монокультуре *L. crispatus*, были идентифицированы у 107 обследованных, что составило 81,7%, а в ассоциациях с другими представителями семей-

Таблица 1. Характеристика колонизационной резистентности бактерий семейства *Lactobacillaceae* (% / абс. число изолятов)
Table 1. Characteristics of colonization resistance of bacteria of the *Lactobacillaceae* family (% / absolute number of isolates)

Микробиота / <i>Microbiota</i>	<i>Lactobacillaceae</i> не обнаружены / <i>not detected</i> (n = 147)	<i>Lactobacillaceae</i> обнаружены / <i>detected</i> (n = 300)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	12,2* / 18	70,3* / 211
<i>Enterococcus</i> spp.	23,1 / 34	22,7 / 68
<i>Streptococcus</i> spp.	32,0* / 47	21,0* / 63
<i>Staphylococcus</i> spp.	47,0* / 70	35,7* / 107
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	28,6* / 42	17,0* / 51
<i>Candida</i> spp.	15,0* / 22	28,3* / 85

* различия статистически значимы ($p < 0,05$); n – количество пациенток.
* differences are statistically significant ($p < 0,05$); n – number of patients.

ства *Lactobacillaceae*, состоящих из двух и более изолятов, – у 24 (18,3%). Чаще всего регистрировались ассоциации *L. crispatus* с *Limosilactobacillus fermentum* (ранее *Lactobacillus fermentum*), которые обнаружены в 37,5% случаев (у 9 пациенток).

Частота обнаружения доминирующих видов лактобацилл в отделяемом влагалища женщин различных возрастов представлена на рис. 2. В возрастной группе пациенток от 18 до 45 лет количество выделенных *L. crispatus* было максимальным. Установлено, что с возрастом у пациенток снижается количество *L. crispatus* (к 57 годам уменьшается почти в 3 раза). На фоне снижения *L. crispatus* с увеличением возраста женщин увеличивается частота обнаружения *L. gasseri*, что подтверждается линией тренда. Отмечены незначительные изменения количества *L. jensenii* у пациенток в возрасте от 0 до 55 лет, в возрастной группе 57–66 лет лактобациллы этого вида не были обнаружены.

Анализ колонизационной резистентности бактерий семейства *Lactobacillaceae* в отношении других идентифицированных микроорганизмов вагинального микробиома всех обследованных женщин представлен в табл. 1.

Сравнительная характеристика количества изолятов бактериальных патогенов в вагинальном консорциуме при отсутствии и наличии лактобацилл выявила, что при обнаружении в микробиоме лактобацилл в целом достоверно реже идентифицировались бактерии родов *Streptococcus* – 21,0% ($\chi^2 = 6,403$; $p = 0,011$), *Staphylococcus* – 35,7% ($\chi^2 = 5,893$;

$p = 0,015$) и семейства *Enterobacteriaceae* – 17,0% ($\chi^2 = 8,017$; $p = 0,005$). Вместе с тем количество бактерий рода *Bifidobacterium* – 70,3% ($\chi^2 = 133,24$; $p = 0,001$) и грибов рода *Candida* – 28,3% ($\chi^2 = 9,682$; $p = 0,002$) достоверно выше при обнаружении во влагалищном консорциуме лактобацилл. Статистически значимого снижения частоты обнаружения бактерий рода *Enterococcus* при обнаружении лактобацилл не выявлено.

Анализ частоты обнаружения выявленных патогенов на фоне присутствия в микробном консорциуме только *L. crispatus* или *L. gasseri* в сравнении с наличием всех видов лактобацилл представлен в табл. 2.

Исследование колонизационной резистентности *L. crispatus* выявило достоверно значимое влияние их на подавление роста бактерий рода *Streptococcus* – 13,7% ($\chi^2 = 4,18$; $p = 0,04$) и семейства *Enterobacteriaceae* – 9,9% ($\chi^2 = 5,8$; $p = 0,016$) при сравнении с наличием в консорциуме других видов лактобацилл. Вместе с тем установлена тенденция снижения частоты обнаружения бактерий родов *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* и грибов рода *Candida*, но различия статистически не достоверны.

Анализ колонизационной резистентности бактерий *L. gasseri* в отношении указанных ассоциантов влагалищного консорциума не выявил статистически значимого снижения частоты их обнаружения. При этом статистически достоверно чаще обнаруживались бактерии родов *Streptococcus* – 36,8% ($\chi^2 = 13,172$; $p = 0,001$), *Staphylococcus* – 50,0% ($\chi^2 = 7,873$; $p = 0,005$) и грибы рода *Candida* – 39,7% ($\chi^2 = 5,601$; $p = 0,018$). Оценить влияние изолятов *L. jensenii* на частоту обнаружения микроорганизмов, входящих в состав вагинального сообщества, не представилось возможным вследствие их незначительного количества ($n = 30$).

Поддержание женского здоровья, в т.ч. микробиоты вагинального содержимого, начиная с рождения девочки и на протяжении жизни имеет большое значение. Вклад лактобацилл в поддержание колонизационной резистентности влагалища и репродуктивного здоровья в настоящее время признается всеми исследователями и практикующими врачами. Вместе с тем результаты научных работ, оценивающие состав микробиоты влагалища в динамике, противоречивы и не позволяют проводить оценку «здорового» бактериального состава.

Грамположительные кокки родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* составляют незначительную часть консорциу-

Таблица 2. Характеристика колонизационной резистентности *L. crispatus* и *L. gasseri* (% / абс. число изолятов)
Table 2. Characteristics of colonization resistance of *L. crispatus* and *L. gasseri* (% / absolute number of isolates)

Микробиота / <i>Microbiota</i>	Все виды лактобацилл кроме / <i>All lactobacilli species except</i> <i>L. crispatus</i> (n = 169)	<i>L. crispatus</i> (n = 131)	Все виды лактобацилл кроме / <i>All lactobacilli species except</i> <i>L. gasseri</i> (n = 232)	<i>L. gasseri</i> (n = 68)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	74,0 / 125	64,9 / 85	67,7 / 157	79,4 / 54
<i>Enterococcus</i> spp.	25,4 / 43	16,8 / 22	21,1 / 49	27,9 / 19
<i>Streptococcus</i> spp.	23,1* / 39	13,7* / 18	16,4* / 38	36,8* / 25
<i>Staphylococcus</i> spp.	36,7 / 62	29,8 / 39	31,5* / 73	50,0* / 34
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	20,1* / 34	9,9* / 13	15,5 / 36	22,1 / 15
<i>Candida</i> spp.	31,4 / 53	24,4 / 32	25,0* / 58	39,7* / 27

* различия статистически значимы ($p < 0,05$), n – количество пациенток.
* differences are statistically significant ($p < 0,05$), n – number of patients.

ма вагинальной микробиоты и относятся к комменсалам, но при угасании защитных функций организма возможен переход их в статус патогена. Результаты данного исследования структуры изолятов рода *Staphylococcus* выявили, что во всех возрастных группах преобладали *S. epidermidis* (46,2–55,9%) и *S. aureus* (7,7–15,4%). Анализ колонизационной резистентности лактобацилл в целом свидетельствует о подавлении роста бактерий *Staphylococcus* spp., частота их обнаружения снижается в 1,3 раза, в сообществе с *L. crispatus* – в 1,6 раз. Группа бактерий рода *Streptococcus* была представлена преимущественно *S. agalactiae*, являющегося главным неонатальным патогеном, и «зелеными» группы *viridans*. Полученные результаты также указывают на то, что на фоне лактобацилл частота обнаружения бактерий рода *Streptococcus* снижается в 1,5 раза, *L. crispatus* – в 2,3 раза.

В группе бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, входящих в вагинальное сообщество, в 65,6% случаев идентифицировались *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. – 22,6%. Частота обнаружения этих бактерий в когортах, где обнаружены *Lactobacillaceae* и *L. crispatus*, снижена соответственно в 1,7 и 2,9 раза.

Бактерии рода *Enterococcus* являются комменсалами желудочно-кишечного тракта, но могут колонизировать слизистую влагалища, конкурируя с другими представителями микробиоты, тем самым становясь патогеном. Во всей популяции обследованных женщин чаще всего идентифицировались *E. faecalis*, что составило >90% относительно *Enterococcus* spp. Несмотря на то, что статистически значимого влияния лактобацилл на подавление роста *Enterococcus* spp. не выявлено, частота обнаружения этих бактерий при наличии в консорциуме *L. crispatus* также снижается в 1,4 раза.

Частота обнаружения *Bifidobacterium* spp. в вагинальном микробном консорциуме при наличии *Lactobacillaceae* в 5,8 раза выше, чем при их отсутствии. Вероятнее всего, это можно объяснить биоценотическим взаимодействием этих бактерий.

Грибы рода *Candida* относятся к комменсалам микробиоты человека, в частности колонизирующими слизистую влагалища женщин, но при ослаблении иммунитета и при наличии благоприятных условий для размножения представляют собой угрозу. Имеются данные о том, что продукция биосурфактантов вагинальными штаммами *L. crispatus* приводит к уменьшению адгезивных свойств *Candida* spp. [19] и ингибирует рост и образование гиф *C. albicans* [2]. Результаты представленного исследования свидетельствуют о том, что из всех выделенных изолятов дрожжевых грибов *C. albicans* идентифицировались в 87,5% случаев, единичными были: *C. tropicalis*, *C. inconspicua*, *C. glabrata* и *C. lusitaniae*. Показано, что частота обнаружения грибов рода *Candida* при наличии лактобацилл в микробном консорциуме влагалища возрастает в 1,9 раза по сравнению с когортой «лактобациллы не обнаружены».

Таким образом, результаты исследования вагинального сообщества обследованных пациенток свидетельствуют о том, что в структуре семейства *Lactobacillaceae* преобладают *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Статистически достоверные данные получены только о влиянии семейства

Lactobacillaceae на подавление роста бактерий родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и семейства *Enterobacteriaceae*; при доминировании *L. crispatus* – бактерий родов *Streptococcus* и семейства *Enterobacteriaceae*. В то же время говорить о колонизационной резистентности *L. crispatus* в отношении других представителей микробного вагинального сообщества не представляется возможным. Полученные данные, указывающие на благоприятное влияние *L. gasseri* на персистенцию грибов рода *Candida*, должны обратить внимание акушеров-гинекологов на рациональность назначения препаратов, содержащих лактобактерии в комплексном лечении кандидозной инфекции. В этой связи считаем актуальным продолжение исследований, направленных на изучение антагонистической активности с учетом видовой характеристики изолятов семейства *Lactobacillaceae* в отношении различных групп бактерий вагинального сообщества.

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 interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The female vaginal microbiome in health and bacterial vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Apr 7;11:631972. DOI: 10.3389/fcimb.2021.631972
2. Sun Z, Ge X, Qiu B, Xiang Z, Jiang C, Wu J, et al. Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: microflora changes and probiotic therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2023 Feb; 13:1123026. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1123026
3. Зорников ДЛ. Особенности видового состава вагинальной лактофлоры и возможности коррекции дисбиоза влагалища у женщин репродуктивного возраста. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2017.
4. Дадаева ДГ. Особенности микробиоценоза влагалища перед родами и в послеродовом периоде. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2019;68(4):35-45. DOI: 10.17816/JOWD68435
5. Саидова ФИ, Рахматуллаева ММ. Лактобактерии и микробиоценоз влагалища. Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы V Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека». 2019, Иваново: ИГМА; 2019:621-626.
6. Старикова ЕВ, Кошечкин СИ, Демкин ВВ. Профаговые последовательности в геномах вагинальных видов лактобактерий. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020;38(2):82-89. DOI: 10.17116/molgen20203802182
7. Skowron K, Walecka-Zacharska E, Kapischke NW, Grudlewska K, Bernaciak Z, Gralewska A, et al. Effect of *Lactobacillus* spp. strains on the population of *Listeria monocytogenes* isolated from human vagina. *Medical Research Journal.* 2021;6(1):8-15. DOI: 10.5603/MRJ.a2021.0001
8. Zhang X, Mushajiang S, Luo B, Tian F, Ni Y, Yan W. The composition and concordance of *Lactobacillus* populations of infant gut and the corresponding breast-milk and maternal gut. *Front Microbiol.* 2020;11:597911. DOI: 10.3389/fmicb.2020.597911

9. Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020 Jan 1;2020:baaa062. DOI: 10.1093/database/baaa062
10. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genus, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Apr 15;70(4):2782-2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107
11. Пестрикова ТЮ, Котельникова АВ. Видовой состав вагинальной лактофлоры у женщин с заболеваниями влагалища и шейки матки. Женское здоровье и репродукция. 2021;2(49):16-25.
12. Roachford OSE, Alleyne AT, Nelson KE. Insights into the vaginal microbiome in a diverse group of women of African, Asian and European ancestries. Peer J. 2022;10:14449. DOI: 10.7717/peerj.14449
13. Shabayek S, Abdellah AM, Salah M, Ramadan M, Fahmy N. Alterations of the vaginal microbiome in healthy pregnant women positive for group B Streptococcus colonization during the third trimester. BMC Microbiol. 2022 Dec 21;22(1):313. DOI: 10.1186/s12866-022-02730-8
14. Годовалов АП, Карпунина ТИ. Функционально-метаболическая активность микроорганизмов рода *Lactobacillus*, изолированных из вагинального биотопа. Сборник тезисов докладов. 2022;117-119. DOI: 10.34756/GEOS.202217.38316
15. Szczerbiec D, Piechocka J, Glowacki R, Torzewska A. Organic acids secreted by *Lactobacillus* spp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*. Molecules. 2022 Aug 29;27(17):5557. DOI: 10.3390/molecules27175557
16. Tarracchini C, Argentini C, Alessandri G, Lugli GA, Mancabelli L, Fontana F, et al. The core genome evolution of *Lactobacillus crispatus* as a driving force for niche competition in the human vaginal tract. Microb Biotechnol. 2023 Jul 25;16(9):1774-1789. DOI: 10.1111/1751-7915.14305
17. Кузьмин ВН, Стома ИО, Адамян ЛВ. Микробиом в акушерстве и гинекологии: переоценка взглядов на микробное сообщество репродуктивной системы. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020;9(2):94-98. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-94-98
18. Лебедева ОП, Грязнова МВ, Козаренко ОН, Сыромятников МЮ, Попов ВН. Микробиом влагалища при нарушениях менструального цикла (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2021;7(4):433-450. DOI: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-9
19. Abou Chacra L, Fenollar F, Diop K. Bacterial vaginosis: what do we currently know? Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jan 18;11:672429. DOI: 10.3389/fcimb.2021.672429
20. Holdcroft AM, Ireland DJ, Payne MS. The Vaginal microbiome in health and disease – what role do common intimate hygiene practices play? Microorganisms. 2023 Jan 23;11(2):298. DOI: 10.3390/microorganisms11020298
21. Argentini C, Fontana F, Alessandri G, Lugli GA, Mansabelli L, Ossirandi MC, et al. Evaluation of modulatory activities of *Lactobacillus crispatus* strains in the context of the vaginal microbiota. ASM Journals Microbiology Spectrum. 2022 Apr 27;10(2):e0273321. DOI: 10.1128/spectrum.02733-21
22. Роговская СИ, Бебнева ТН, Москвичёва ВС. Микробиота влагалища и цервикальные неоплазии. М., 2021.
23. Faro S, Martens M. Why screen the vaginal microbiome? Obstet Gynecol Int J. 2022;13(2):116-119. DOI:10.15406/ogij.2022.13.00635
24. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. Microbiome. 2020 Nov 23;8(1):166. DOI: 10.1186/s40168-020-00934-6
25. Mancabelli L, Mancino W, Lugli GA, Milani C, Viappiani A, Anzalone R, et al. Comparative genome analyses of *Lactobacillus crispatus* isolates from different ecological niches reveal an adaptation of this species to the human vaginal environment. ASM Journals Applied and Environmental Microbiology. 2021 Apr 15;87(8):e02899-20. DOI: 10.1128/AEM.02899-20
26. Pendharker S, Skafte-Holm A, Simsek G, Haahr T. Lactobacilli and their probiotic effects in the vagina of reproductive age women. Microorganisms. 2023 Mar 1;11(3):636. DOI: 10.3390/microorganisms11030636
27. Hertzberger R, May A, Kramer G, van Vondelen I, Molenaar D, Kort R. Genetic elements orchestrating *Lactobacillus crispatus* glycogen metabolism in the vagina. Int J Mol Sci. 2022 May 17;23(10):5590. DOI: 10.3390/ijms23105590
28. Спиридонова НВ, Каганова МА, Девятова ОО, Безрукова АА. Особенности микробиоты цервикального канала во втором триместре беременности при истмико-цервикальной недостаточности с клиникой вульвовагинита в зависимости от pH влагалищного содержимого. Доктор.Ру. 2021;20(6):12-19. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-6-12-19

References

- Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The female vaginal microbiome in health and bacterial vaginosis. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Apr 7;11:631972. DOI: 10.3389/fcimb.2021.631972
- Sun Z, Ge X, Qiu B, Xiang Z, Jiang C, Wu J, et al. Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: microflora changes and probiotic therapy. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2023 Feb; 13:1123026. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1123026
- Zornikov DL. Osobennosti vidovogo sostava vaginal'noi laktoflory i vozmozhnosti korrektsii disbioza vlagalishcha u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta. Avtoref. diss. ... kand. med. nauk. Chelyabinsk, 2017. (In Russian).
- Dadaeva DG. Vaginal microbiocenosis in the prenatal and postnatal periods. J of Obstetrics and Women's Diseases. 2019;68(4):3545. DOI: 10.17816/JOWD68435 (In Russian).
- Saidova FI, Rakhmatullaeva MM. Laktobakterii i mikrobitsenoz vlagalishcha. Mediko-biologicheskie, klinicheskie i sotsial'nye voprosy zdorov'ya i patologii cheloveka: materialy V Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiem. «Mediko-biologicheskie, klinicheskie i sotsial'nye voprosy zdorov'ya i patologii cheloveka». 2019, Ivanovo: IGMA; 2019;621-626. (In Russian).
- Starikova EV, Koshechkin SI, Demkin VV. Prophage sequences in genomes of vaginal lactobacteria. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2020;38(2):82-89. DOI: 10.17116/molgen20203802182 (In Russian).
- Skowron K, Walecka-Zacharska E, Kapischke NW, Grudlewska K, Bernaciak Z, Gralewska A, et al. Effect of *Lactobacillus* spp. strains on the population of *Listeria monocytogenes* isolated from human vagina. Medical Research Journal. 2021;6(1):8-15. DOI: 10.5603/MRJ.a2021.0001
- Zhang X, Mushajiang S, Luo B, Tian F, Ni Y, Yan W. The composition and concordance of *Lactobacillus* populations of infant gut and the corresponding breast-milk and maternal gut. Front Microbiol. 2020;11:597911. DOI: 10.3389/fmicb.2020.597911
- Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020 Jan 1;2020:baaa062. DOI: 10.1093/database/baaa062
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genus, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Apr 15;70(4):2782-2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107
- Pestrikova TYu, Kotelnikova AV. Species composition of vaginal lactoflora in women with vaginal and cervical diseases. Zhenskoe zdorov'e i reproduktivnaya. 2021;2(49):16-25. (In Russian).

12. Roachford OSE, Alleyne AT, Nelson KE. Insights into the vaginal microbiome in a diverse group of women of African, Asian and European ancestries. *Peer J*. 2022;10:14449. DOI: 10.7717/peerj.14449
13. Shabayek S, Abdellah AM, Salah M, Ramadan M, Fahmy N. Alterations of the vaginal microbiome in healthy pregnant women positive for group B Streptococcus colonization during the third trimester. *BMC Microbiol*. 2022 Dec 21;22(1):313. DOI: 10.1186/s12866-022-02730-8
14. Godovalov AP, Karpunina TI. Funktsional'no-metabolicheskaya aktivnost' mikroorganizmov roda *Lactobacillus*, izolirovannykh iz vaginal'nogo biotopa. Sbornik tezisev dokladov. 2022;117-119. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38316 (In Russian).
15. Szczerbiec D, Piechocka J, Glowacki R, Torzewska A. Organic acids secreted by *Lactobacillus* spp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules*. 2022 Aug 29;27(17):5557. DOI: 10.3390/molecules27175557
16. Tarracchini C, Argentin C, Alessandri G, Lugli GA, Mancabelli L, Fontana F, et al. The core genome evolution of *Lactobacillus crispatus* as a driving force for niche competition in the human vaginal tract. *Microb Biotechnol*. 2023 Jul 25;16(9):1774-1789. DOI: 10.1111/1751-7915.14305
17. Kuzmin VN, Stoma IO, Adamyan LV. Microbiome in obstetrics and gynecology: a reassessment of views on the microbial community of the reproductive system. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2020;9(2):94-98. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-94-98 (In Russian).
18. Lebedeva OP, Gryaznova MV, Kozarenko ON, Syromyatnikov MYu, Popov VN. Vaginal microbiome in patients with menstrual cycle disorders (review). *Research Results in Biomedicine*. 2021;7(4):433-450. DOI: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-9 (In Russian).
19. Abou Chacra L, Fenollar F, Diop K. Bacterial vaginosis: what do we currently know? *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jan 18;11:672429. DOI: 10.3389/fcimb.2021.672429
20. Holdcroft AM, Ireland DJ, Payne MS. The Vaginal microbiome in health and disease-what role do common intimate hygiene practices play? *Microorganisms*. 2023 Jan 23;11(2):298. DOI: 10.3390/microorganisms11020298
21. Argentin C, Fontana F, Alessandri G, Lugli GA, Mansabelli L, Ossirandi MC, et al. Evaluation of modulatory activities of *Lactobacillus crispatus* strains in the context of the vaginal microbiota. *ASM Journals Microbiology Spectrum*. 2022 Apr 27;10(2):e0273321. DOI: 10.1128/spectrum.02733-21
22. Rogovskaya SI, Bebneva TN, Moskvicheva VS. Mikrobiota vlagalishcha i tservikal'nye neoplazii. Moscow, 2021. (In Russian).
23. Faro S, Martens M. Why screen the vaginal microbiome? *Obstet Gynecol Int J*. 2022;13(2):116-119. DOI:10.15406/ogij.2022.13.00635
24. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome*. 2020 Nov 23;8(1):166. DOI: 10.1186/s40168-020-00934-6
25. Mancabelli L, Mancino W, Lugli GA, Milani C, Viappiani A, Anzalone R, et al. Comparative genome analyses of *Lactobacillus crispatus* isolates from different ecological niches reveal an adaptation of this species to the human vaginal environment. *ASM Journals Applied and Environmental Microbiology*. 2021 Apr 15;87(8):e02899-20. DOI: 10.1128/AEM.02899-20
26. Pendharkar S, Skafte-Holm A, Simsek G, Haahr T. Lactobacilli and their probiotic effects in the vagina of reproductive age women. *Microorganisms*. 2023 Mar 1;11(3):636. DOI: 10.3390/microorganisms11030636
27. Hertzberger R, May A, Kramer G, van Vondelen I, Molenaar D, Kort R. Genetic elements orchestrating *Lactobacillus crispatus* glycogen metabolism in the vagina. *Int J Mol Sci*. 2022 May 17;23(10):5590. DOI: 10.3390/ijms23105590
28. Spiridonova NV, Kaganova MA, Devyatova OO, Bezrukova AA. Cervical Canal Microbiota Features in Second Trimester of Pregnancy in Insuficiencia Istmicocervical with Clinical Signs of Vulvovaginitis Depending on Vaginal Discharge pH. *Doctor.Ru*. 2021;20(6):12-19. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-6-12-19 (In Russian).

Информация о соавторах:

Ташланова Виктория Владимировна, биолог бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Вакарина Арина Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Охотникова Елена Владимировна, акушер-гинеколог ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Степанова Ксения Борисовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующая клиникой ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Степанова Татьяна Федоровна, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Victoria V. Tashlanova, biologist of the bacteriological laboratory, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology

Arina A. Vakarina, MD, PhD, senior researcher, bacteriological laboratory Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology

Elena V. Okhotnikova, obstetrician-gynecologist, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology

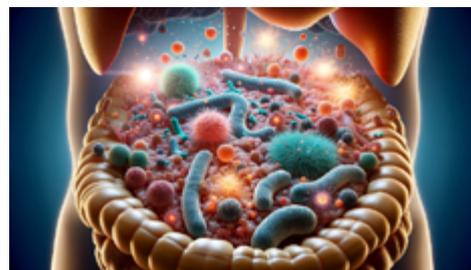
Ksenia B. Stepanova, MD, PhD, leading researcher, head of clinic, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology

Tatyana F. Stepanova, MD, PhD, DSc, professor, director Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology

НОВОСТИ НАУКИ

Микробиота кишечника связана с поведением, вызывающим социальную тревогу

Результаты исследования показали, что микробиом играет решающую роль в реакциях социального страха и может быть потенциальной терапевтической мишенью для тяжелых тревожных расстройств (ТТР). У пациентов с ТТР наблюдались аналогичные изменения состава микробиоты с бета-разнообразием, что и у мышей-реципиентов. Количество *Phocaeicola massiliensis*, *Bacteroides nordii* и *Bacteroides cellulosilyticus* было ниже в группе с социально тревожным расстройством, чем в здоровой контрольной группе. Перенос микроорганизмов ТТР может усилить реакцию социального страха.



Ritz NL, Brocka M, Butler MI, Cowan CSM, Barrera-Bugueño C, Turkington CJR, et al. Social anxiety disorder-associated gut microbiota increases social fear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 Jan 2;121(1):e2308706120. DOI: 10.1073/pnas.2308706120

Изучение гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели

А.А.Самойлова¹, Л.А.Краева^{1,2}, И.В.Лихачев¹, Н.В.Михайлов^{1,3}, Д.Д.Светлов¹

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

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Гипервирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* (hvKp), в отличие от классических (сKp), способны вызывать инвазивные инфекции у здоровых взрослых людей. Опасность распространения hvKp, особенно в медицинских учреждениях, требует разработки методов дифференциации hvKp и сKp с помощью биомаркеров на модели животных *in vivo*.

Цель работы – доказать вирулентность штаммов *K. pneumoniae* на биологической модели, оценить возможность прогнозирования вирулентности молекулярно-генетическими и фенотипическими методами.

Материалы и методы. Для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* использовали самок белых аутбредных мышей. Летальность, связанную с клебсиеллезной инфекцией, подтверждали выделением чистых культур из крови и паренхиматозных органов мышей. Значение LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева. Патоморфологические изменения органов оценивали у животных на гистологических срезах. Все данные подвергали статистическому анализу.

Результаты. По результатам эксперимента клинические штаммы *K. pneumoniae* были разделены на три группы: гипервирулентные (LD₅₀ ≤ 10² КОЕ/животное), вирулентные (LD₅₀ от 10³ до 10⁵ КОЕ/животное) и авирулентные (LD₅₀ ≥ 10⁶ КОЕ/животное). Гипервирулентные штаммы принадлежали к капсульному типу K2, сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65. По результатам статистического анализа достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для следующих капсульных типов и генов: K1 ($p = 0,0134$), K2 ($p = 0,0084$), K57 ($p = 0,0050$) и *iucA* ($p = 0,0042$), *iroB* ($p = 0,0002$). Достоверная связь между наличием фенотипического признака и вирулентностью штамма была выявлена для стринг-теста ($p = 0,0044$).

Заключение. Единичные признаки обладают меньшей чувствительностью и специфичностью, чем совокупность признаков. Наибольшая чувствительность и специфичность была выявлена для совокупности признаков капсульных типов K1 и K2, типов последовательностей сидерофора иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16*, типов последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и гена синтеза сидерофора сальмохелина *iroB* – 100 и 92,8% соответственно.

Ключевые слова: гипервирулентность, *Klebsiella pneumoniae*, hvKp, сKp

Для цитирования: Самойлова А.А., Краева Л.А., Лихачев И.В., Михайлов Н.В., Светлов Д.Д. Изучение гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели. Бактериология. 2024; 9(2): 21–28. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-21-28

Evaluation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a biological model

A.A.Samoilova¹, L.A.Kraeva^{1,2}, I.V.Likhachev¹, N.V.Mikhailov^{1,3}, D.D.Svetlov¹

¹Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;

²S.M.Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russian Federation;

³V.A.Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation

Hypervirulent strains of *Klebsiella pneumoniae* are capable of causing invasive infections in healthy adults. To date, no biomarkers have been identified that can accurately differentiate hypervirulent strains from classical ones. *In vivo* experiments are needed for a more complete understanding of infectious processes.

Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» Минобороны России

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

Статья поступила 13.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Ludmila A. Kraeva, MD, PhD, DSc, associate Professor, Head of the laboratory of medical bacteriology, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Microbiology, S.M.Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense

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

The article was received 13.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

The purpose of the work is to study the virulence of *K. pneumoniae* strains using a biological model, to evaluate the possibility of predicting virulence using molecular genetic and phenotypic methods.

Materials and methods. White outbred mice were used to assess the virulence of *K. pneumoniae* strains. The LD₅₀ value was calculated using the Kerber method modified by Ashmarin and Vorobiev. All data were subjected to statistical analysis.

Results. Clinical *K. pneumoniae* strains were divided into three groups: hypervirulent (LD₅₀ ≤ 10² CFU/animal), virulent (LD₅₀ 10³ to 10⁵ CFU/animal) and avirulent (LD₅₀ ≥ 10⁶ CFU/animal). Hypervirulent strains belonged to the capsule type K2, sequence types ST-86 and ST86-1LV, ST395, ST65. Significant relationship between the presence of the gene and the virulence of the strain was identified for the following capsular types K1 (*p* = 0.0134), K2 (*p* = 0.0084), K57 (*p* = 0.0050) and genes: *iucA* (*p* = 0.0042), *iroB* (*p* = 0.0002).

Conclusions. String test had high reliability (*p* = 0.0044), but the sensitivity and specificity are relatively low (87.5% and 64.3%, respectively). The highest sensitivity and specificity were revealed for a set of features of capsular types K1 and K2, siderophore yersiniabactin sequence types *ybt14*, *ybt16*, colibactin siderophore *clb3* sequence types and the siderophore salmochelin synthesis gene *iroB* – 100% and 92.8%, respectively.

Key words: hypervirulence, *Klebsiella pneumoniae*, hvKp, cKp

For citation: Samoilova A.A., Kraeva L.A., Likhachev I.V., Mikhailov N.V., Svetlov D.D. Evaluation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a biological model. Bacteriology. 2024; 9(2): 21–28. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-21-28

Гипервирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) впервые были обнаружены в середине 1980-х гг. на Тайване [1]. Этот новый вариант гипервирулентных изолятов отличается от классических штаммов *K. pneumoniae* (сKp) способностью вызывать инвазивные инфекции даже у здоровых взрослых. Штаммы hvKp имеют тенденцию к образованию абсцессов печени и способны метастазировать из первичного очага инфекции в отдаленные органы, включая чаще всего глаза, легкие и центральную нервную систему [2–4]. Помимо абсцессов печени, hvKp также вызывает бактериемию, пневмонию и инфекции мягких тканей [5].

Генетические детерминанты гипервирулентности часто обнаруживаются на больших плаزمиды вирулентности, а также на хромосомных мобильных генетических элементах, которые можно использовать в качестве биомаркеров для отличия клинических изолятов hvKp от сKp [6–7]. В настоящее время не существует единой категоризации, охватывающей все штаммы hvKp. Клинические проявления, капсульное типирование, сиквенс-типирование, гипермукоидный фенотип и наличие генов, ассоциированных с вирулентностью, могут быть использованы для дифференциации штаммов hvKp и сKp [5, 8].

Гипервирулентность *K. pneumoniae* можно охарактеризовать как способность бактерий вызывать инвазивные инфекции (метастатическое распространение) как осложнение первичного очага инфекции у практически здоровых взрослых [8]. Инфекции, вызванные гипервирулентной формой *K. pneumoniae*, часто диагностируются на основании клинической картины, поскольку не существует универсально согласованного маркера гипервирулентности [2]. Большинство hvKp-штаммов фенотипически проявляет гипермукоидность, которая считается одним из основных маркеров hvKp-штаммов. Гипермукоидный фенотип часто определяют при помощи стринг-теста – тест является положительным, если нить длиной >5 мм тянется за бактериологической петлей от колонии бактериальной культуры, выращенной на плотной питательной среде [9].

Понятия «гипермукоидный» и «гипервирулентный» часто используются в литературе как синонимы; однако не все гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* имеют гипермукоидный фенотип, и не все гипермукоидные изоляты приводят к инвазивному синдрому [8, 10].

Изначально штаммы hvKp были обнаружены в основном в Азии и лишь изредка были устойчивы к антимикробным препаратам (АМП). Однако недавние статьи указывают на их появление в новых географических регионах и распространение множественной лекарственной устойчивости среди гипервирулентных штаммов [11]. Появление изолятов *K. pneumoniae* с комбинированной гипервирулентностью и устойчивостью к резервным АМП, таким как карбапенемы, представляет серьезную опасность. При объединении устойчивости к АМП и вирулентности hvKp-штаммы могут вызывать инфекции, трудно поддающиеся лечению, у ранее здоровых взрослых. В случае если штаммы hvKp распространятся в медицинских учреждениях, вызывая инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом, можно ожидать еще более высокую заболеваемость и смертность [11].

Несколько исследований *in vitro* охарактеризовали патогенность штаммов *K. pneumoniae* и описали лежащие в их основе молекулярные механизмы и их стратегии уклонения от иммунитета [12]. Разработка инновационных моделей *in vitro* многообещающа, но сложность физиологии хозяина (иммунитет, микробиота и динамика физико-химических условий) часто трудно воспроизвести в одной модели *in vitro* [13]. Эти данные часто необходимо дополнять экспериментами *in vivo*, чтобы лучше понять взаимодействие хозяина и патогена [14]. Хотя этические нормы, применяемые к моделям *in vivo*, требуют строгого контроля и ограничения их использования, они, тем не менее, необходимы для более полного понимания инфекционных процессов [14]. Наиболее часто используются модели млекопитающих из-за их надежности в имитации инфекций человека, связанных с *K. pneumoniae* [14].

Цель данной работы – изучить вирулентность штаммов *K. pneumoniae* на биологической модели и оценить возможность прогнозирования вирулентности доступными молекулярно-генетическими и фенотипическими методами.

Материалы и методы

Эксперимент на животных одобрен биоэтической комиссией НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. Все мыши содержались в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза по

защите животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г.

На первом этапе исследования беспородным самкам мышей (19–24 г) ($n = 90$) внутрибрюшинно вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозе $1 \cdot 10^6$. Указанной дозой заражали трех мышей. Бактериальные суспензии готовили с использованием физиологического раствора из суточных культур. В работе исследовали 30 изолятов *K. pneumoniae*, отобранных по следующим параметрам: капсульный тип (K1, K2, K57, характерные для вирулентных штаммов), наличие положительного стринг-теста. Три изолята с индексом вирулентности 0 были выбраны в качестве контрольных.

За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения. Смертность, связанную с *K. pneumoniae*, подтверждали выделением чистых культур *K. pneumoniae* из крови и паренхиматозных органов мышей (печень, селезенка, легкие) и гистологическим исследованием пораженных органов.

Для определения среднелетальной дозы (LD_{50}) штаммов *K. pneumoniae* для мышей отобрали изоляты, которые вызвали гибель животных в дозе $1 \cdot 10^6$ КОЕ/животное. На втором этапе исследования самкам мышей ($n = 102$) вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозах $1 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное. За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения. LD_{50} рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева [15].

Патоморфологические изменения печени и селезенки оценивали у животных контрольной и опытной групп на гистологических срезах, окраска гематоксилин/эозин, увеличение $\times 40$, $\times 90$. Контрольная группа включала животных, зараженных авирулентным штаммом ($n = 3$), а опытная – вирулентными ($n = 3$).

Статистический анализ производили с помощью программного пакета Microsoft Excel. Изучали связь между признаками вирулентности, определенными молекулярно-генетическими и фенотипическими методами, и вирулентностью штаммов, определенной методом биологической пробы на мышах. Связь между наличием признака и вирулентностью штамма оценивали двумя статистическими критериями – точным тестом Фишера и рангово-бисериальным коэффициентом корреляции (с последующим вычислением критерия Стьюдента) – и считали достоверной при полученном критическом уровне значимости $p < 0,05$. Для рангово-бисериального коэффициента корреляции критический уровень значимости $p < 0,05$ при данном объеме выборки достигается в случае, если полученный критерий Стьюдента $t > 2,05$. Для расчета критерия Фишера исследуемые штаммы по результатам биологической пробы на мышах были разделены на 2 группы – вирулентные (включая гипервирулентные) и авирулентные. Для расчета рангово-бисериального коэффициента корреляции все штаммы были проранжированы в порядке возрастания вирулентности в соответствии с LD_{50} (более вирулентному штамму присваивался более высокий ранг). Таким образом, значение рангово-бисериального коэффициента корреляции зависело от степени вирулентности штамма.

С целью оценки возможности применения в качестве диагностического теста для прогнозирования вирулентности наиболее статистически значимые признаки (согласно зна-

чению рангово-бисериального коэффициента) были скомбинированы в группы. Внутри каждой группы признаки вирулентности были ранжированы по убыванию значения критического уровня значимости (признакам, имеющим большую статистическую значимость, присваивался более высокий ранг). Для каждого штамма вычисляли сумму рангов всех признаков, включенных в изучаемую комбинацию. Среднее арифметическое между минимальным значением суммы рангов всех признаков, выявленным у вирулентных штаммов, и максимальным значением суммы рангов всех признаков, выявленным у авирулентных штаммов, было принято за дискриминатное (разделяющее штаммы на вирулентные и авирулентные). Если при расчете ранга выявлялись авирулентные штаммы, имеющие ранг равный или больший, чем самый низкий из вирулентных, их не включали в расчет дискриминатного значения. Это позволяло получить дискриминатное значение, обеспечивающее максимальную чувствительность теста. Специфичность теста при этом снижалась, но при выявлении вирулентных штаммов показатель чувствительности является более важным.

Чувствительность рассчитывали как долю штаммов, классифицированных как вирулентные по результатам исследования фенотипическими и/или молекулярно-генетическими методами, от штаммов, определенных как вирулентные по результатам биологической пробы. Специфичность рассчитывали как долю штаммов, классифицированных как авирулентные по результатам исследования фенотипическими и/или молекулярно-генетическими методами, от штаммов, определенных как авирулентные по результатам биологической пробы.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования мышей заражали дозой $1 \cdot 10^6$ КОЕ/животное. Если животные не погибали в течение периода наблюдения, штаммы считали авирулентными. В случае гибели мышей штаммы *K. pneumoniae* относили к категории вирулентных для мышей, и для них определяли LD_{50} на втором этапе эксперимента.

Из крови и паренхиматозных органов всех погибших мышей была высеяна культура *K. pneumoniae* в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. С целью дополнительного подтверждения причины летального исхода было выполнено патоморфологическое исследование. Для этого были изготовлены гистологические срезы из фрагментов печени и селезенки от животных контрольной и опытной групп.

У погибших животных на поверхности печени располагались обильные скопления фибрина, инфильтрированного полиморфноядерными лейкоцитами, среди которых были расположены скопления микробной флоры (рис. 1 Б1, Б3), в субкапсулярных отделах перенхимы печени имелись крупные фокусы некроза со скудной перифокальной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами (рис. 1 Б3, Б4), а также очаговая лимфогистиоцитарная с примесью полиморфноядерных гепатоцитов инфильтрация, расположенная среди групп погибших гепатоцитов, и скопления незрелых миелоидных клеточных элементов в синусоидах (рис. 1 Б2). У животных из контрольной группы патологических наложений на поверхности капсулы печени не

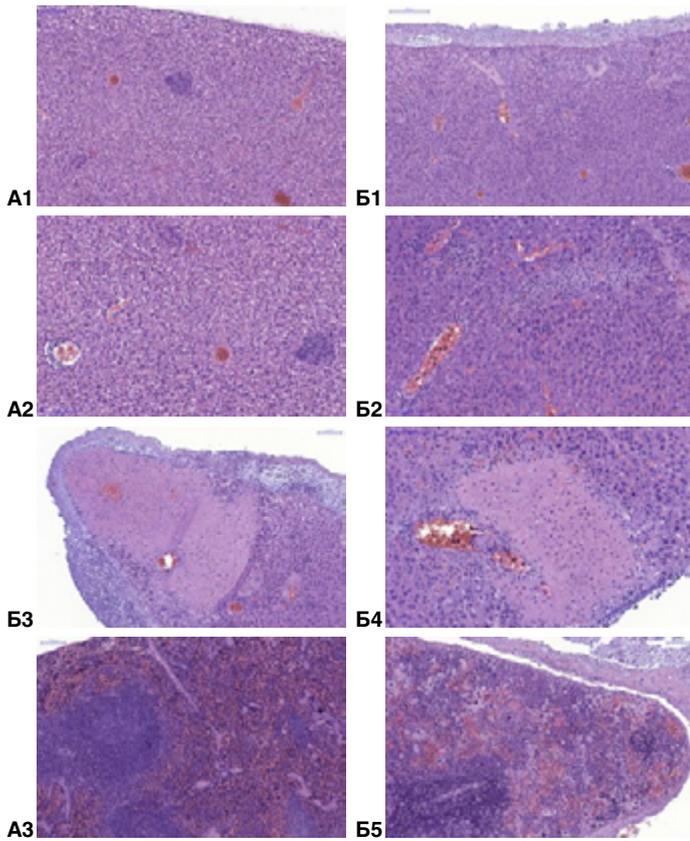


Рис. 1. Патологические изменения печени и селезенки у животного из контрольной (А) и опытной (Б) групп. Окрашивание гематоксилином и эозином, длина масштабного отрезка А1, А2, А3, Б2, Б3, Б4, Б5 – 100 мкм, Б1 – 200 мкм.

Fig. 1. Pathological changes in the liver and spleen in an animal from the control (A) and experimental (B) groups. Staining with hematoxylin and eosin, length of scale segment A1, A2, A3, B2, B3, B4, B5 – 100 μm , B1 – 200 μm .

было, имелись мелкие гистиоцитарные гранулемы в паренхиме печени и распространенная белковая дистрофия гепатоцитов (рис. 1 А1, А2).

Патологические изменения селезенки обнаруживались у животных из опытной группы в виде обильных фибриново-лейкоцитарных наложений на поверхности капсулы селезенки, выраженного полнокровия и миелоидной инфильтрации незрелыми миелоидными клеточными элементами красной пульпы, а также в виде неравномерного лимфоидного опустошения с сохранением немногочисленных мелких лимфоидных фолликулов без герминативных центров (рис. 1 Б5). Нормальное строение селезенки у животных из контрольной группы было сохранено (рис. 1 А3).

Таким образом, у животных опытной группы было установлено наличие фибринозно-гнойного перигепатита, крупноочаговых некрозов печени и очагового паренхиматозного гепатита, а также фибринозно-гнойного периспленита и реактивных изменений селезенки в виде миелоидной инфильтрации красной пульпы и лимфоидного опустошения. У животных из группы контроля были установлены белковая дистрофия гепатоцитов и очаговый гранулематозный гепатит.

На втором этапе исследования животным вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозах $1 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное и наблюдали в течение 14 дней после заражения.

Из крови и паренхиматозных органов всех погибших мышей была высеяна культура *K. pneumoniae*, что подтверждает смерть животного от исследуемого штамма.

Результаты расчета значений LD_{50} и характеристика исследованных в ходе эксперимента штаммов (капсульный тип и ST-тип, стринг-тест, диагноз и индекс вирулентности) представлены в таблице.

По результатам эксперимента клинические штаммы *K. pneumoniae* были разделены на 3 группы: гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ/животное), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ/животное) и авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ/животное).

Гипервирулентные штаммы (по результатам биопробы) *K. pneumoniae* ($n = 6$) принадлежали к капсульному типу K2, сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65 и были выде-

Таблица. Результаты определения значений LD_{50} и характеристика исследованных штаммов
Table. Results of determining LD_{50} values and characteristics of the studied strains

№	Штамм / Strain	К-тип / K-type	ST-тип / ST-type	Стринг-тест, мм / String test, mm	LD_{50}
1	172	K1	ST23	15	$0,22 \cdot 10^3$
2	64	K1	ST23	40	$0,46 \cdot 10^4$
3	844	K1	ST23	40	$0,22 \cdot 10^5$
4	894	K1	ST23	100	$0,22 \cdot 10^3$
5	880	K1	ST23	20	$1 \cdot 10^3$
6	184	K1	ST23	120	$0,46 \cdot 10^4$
7	138	K2	ST380	50	-
8	1	K2	ST65	17	$0,46 \cdot 10^2$
9	2399	K2	ST395	0	$1 \cdot 10^5$
10	480	K2	ST86	0	$1 \cdot 10^1$
11	933	K2	ST395	30	$0,46 \cdot 10^2$
12	396	K2	ST395	10	$1 \cdot 10^1$
13	847	K57	ST23	0	-
14	956	K57	ST23	0	-
15	958	K57	ST23	0	-
16	2943	K57	ST23	0	-
17	2946	K57	ST23	0	-
18	2947	K57	ST23	0	-
19	537	K2	ST86	10	$0,46 \cdot 10^4$
20	67	K2	ST86-1LV	55	$0,46 \cdot 10^2$
21	766	K2	ST86	15	$1 \cdot 10^3$
22	830	K2	ST86	55	$1 \cdot 10^1$
23	962	K24	ST20	50	-
24	60	K45	ST874	0	-
25	336	KL107	ST512	10	-
26	988	KL107	ST512	20	-
27	913	K2	ST395	50	$1 \cdot 10^5$
28	778	K24	ST11	0	-
29	146	K2	ST395	20	-
30	506	K62	ST556	0	-

«-» – штамм в максимальной дозе не вызывал гибель животных.
“-” – the strain at the maximum dose did not cause death in animals.

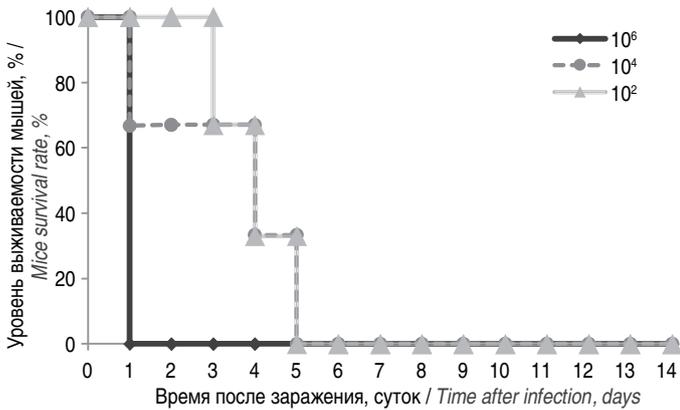


Рис. 2. Выживаемость мышей при заражении бактериями *K. pneumoniae* штамма 480 в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное ($LD_{50} 1 \cdot 10^1$ КОЕ/животное).
 Fig. 2. Survival of mice infected with *K. pneumoniae* strain 480 at doses of 10^6 , 10^4 , 10^2 CFU/animal ($LD_{50} 1 \cdot 10^1$ CFU/animal).

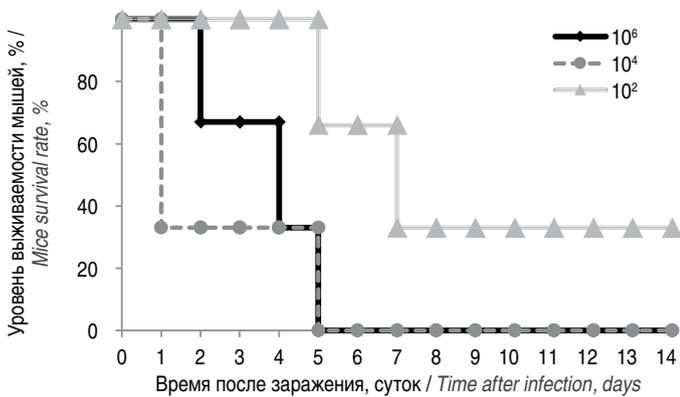


Рис. 3. Выживаемость мышей при заражении бактериями *K. pneumoniae* штамма 67 в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное ($LD_{50} 1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное).
 Fig. 3. Survival of mice infected with *K. pneumoniae* strain 67 at doses of 10^6 , 10^4 , 10^2 CFU/animal ($LD_{50} 1 \cdot 10^2$ CFU/animal).

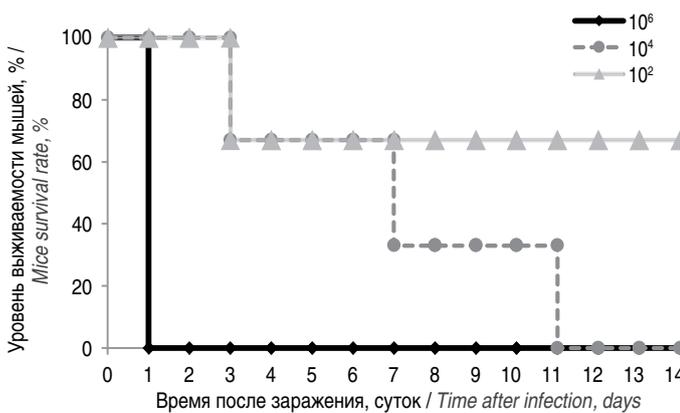


Рис. 4. Выживаемость мышей при заражении бактериями *K. pneumoniae* штамма 172 в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное ($LD_{50} 1 \cdot 10^3$ КОЕ/животное).
 Fig. 4. Survival of mice infected with *K. pneumoniae* strain 172 at doses of 10^6 , 10^4 , 10^2 CFU/animal ($LD_{50} 1 \cdot 10^3$ CFU/animal).

лены от пациентов с некротической раной культы, панкреатитом, флегмоной рубца ($LD_{50} 1 \cdot 10^1$ КОЕ/животное), а также флегмоной поясничной области, синовитом коленного сустава ($LD_{50} 1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное). У 100% гипервирулентных

штаммов присутствовал ген аэробактина *iuc1*, гены регулятора мукоидного фенотипа *rmpA*, *rmpA2*, *wzyK2*, *peg-344*. Гены синтеза сидерофоров иерсиниабактина и сальмохелина были характерны для 67 и 33% гипервирулентных штаммов соответственно. Один штамм показал отрицательный результат стринг-теста.

Вирулентные штаммы (по результатам биопробы) *K. pneumoniae* ($n = 10$) принадлежали к капсульным типам K1 и K2, сиквенс-типам ST23, ST86, ST395 и были выделены от пациентов со следующими диагнозами: флегмоны различной локализации, перитонит, ишемическая болезнь сердца, пневмония, сепсис, синовит правого коленного сустава. Один штамм показал отрицательный результат стринг-теста.

Авирулентные штаммы (по результатам биопробы) *K. pneumoniae* ($n = 13$) принадлежали к капсульным типам K2, K24, K45, K57, K62, KL107, сиквенс-типам ST20, ST23, ST512, ST874 и были выделены от пациентов со следующими диагнозами: сепсис, трофическая язва стопы, флегмона левой голени, гангрена левого легкого, атеросклероз.

Выживаемость мышей при внутрибрюшинном заражении штаммами *K. pneumoniae* в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное показана на рис. 2–4.

По результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера положительная достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для следующих капсульных типов и генов: K1 ($p = 0,0134$), K2 ($p = 0,0084$), K57 ($p = 0,0050$); *iucA* ($p = 0,0042$), *iroB* ($p = 0,0002$). Положительная достоверная связь между наличием фенотипического признака и вирулентностью штамма была выявлена для стринг-теста ($p = 0,0044$). Чувствительность стринг-теста для исследуемой группы штаммов составила 87,5%, специфичность – 64,3%. Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей, определенных на основании полногеномного секвенирования, и вирулентностью штамма была выявлена для типов последовательностей различных локусов вирулентности *ybt1* ($p = 0,0135$), *clb2* ($p = 0,0134$), *iro1* ($p = 0,0002$) и плазмид ICEKp3 ($p = 0,0050$), ICEKp10 ($p = 0,0273$).

Не было выявлено достоверной связи между наличием гена и вирулентностью штамма для следующих генов: *iutA* ($p = 0,2092$), *rmpA* ($p = 0,2125$), *rmpA2* ($p = 0,4666$), *peg-344* ($p = 0,2092$), *terB* ($p = 0,2092$), *peg-589* ($p = 0,0896$), а также плазмид ICEKp5 ($p = 0,5333$), ICEKp12 ($p = 0,0664$). Не было выявлено достоверной связи между наличием типов последовательностей, определенных на основании секвенирования, и вирулентностью штамма для следующих типов последовательностей различных локусов вирулентности: *irp2* ($p = 0,3112$), *ybt12* ($p = 0,4666$), *ybt14* ($p = 0,5333$), *ybt16* ($p = 0,0664$), *ybt17* ($p = 0,5333$), *clb1* ($p = 0,4666$), *clb3* ($p = 0,5333$), *iuc1* ($p = 0,1123$), *iuc2* ($p = 0,4666$), *iro2* ($p = 0,4666$).

По результатам статистического анализа на основании оценки рангово-бисериального коэффициента корреляции была определена связь между наличием признака и степенью вирулентности штамма (значением LD_{50}), оцененная с помощью t-критерия Стьюдента (t). Достоверная положительная связь была выявлена для капсульных типов K1

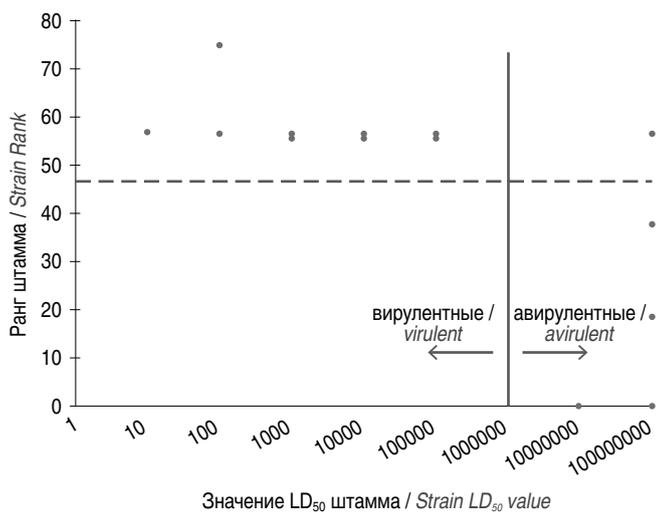


Рис. 5. Зависимость ранга штамма от степени вирулентности (по шести признакам).

На диаграмме точки обозначены штаммы: справа от сплошной линии ($LD_{50} = 1 \cdot 10^6$) – авирулентные, слева – вирулентные. Пунктирная линия, обозначающая дискриминантное значение (согласно значению рангово-бисериального коэффициента), отделяет вирулентные штаммы (сверху) от авирулентных (снизу). Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на вышеуказанных признаках, составила 100%, специфичность – 92,8%.

Fig. 5. Dependence of strain rank on the degree of virulence (based on six characteristics).

On the diagram, the dots indicate strains: to the right of the solid line ($LD_{50} = 1 \cdot 10^6$) are avirulent, to the left are virulent. The dotted line, indicating the discriminant value (according to the value of the rank-biserial coefficient), separates virulent strains (top) from avirulent strains (bottom). The sensitivity of a potential diagnostic test based on the above characteristics was 100%, specificity – 92.8%.

($t = 2,281$), K2 ($t = 2,281$), генов *iucA* ($t = 2,625$), *iutA* ($t = 3,685$), *iroB* ($t = 3,224$), *rmpA* ($t = 2,681$), *rmpA2* ($t = 3,500$), *peg-344* ($t = 3,685$), *terB* ($t = 3,685$), *peg-589* ($t = 3,893$) и плазмид ICEKp35 ($t = 13,500$), ICEKp12 ($t = 2,901$).

Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей и степенью вирулентности штамма была выявлена для типов последовательностей различных локусов вирулентности *ybt1* ($t = 2,281$), *ybt14* ($t = 13,500$), *ybt16* ($t = 2,901$), *ybt17* ($t = 5,556$), *clb2* ($t = 2,281$), *clb3* ($t = 5,556$), *iuc1* ($t = 3,088$), *iro1* ($t = 4,293$).

Для прогнозирования вирулентности штаммов на основе молекулярно-генетических признаков были рассмотрены капсульные типы K1 и K2. Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на определении капсульных типов K1 и K2, составила 100%, специфичность – 85,7%.

С целью более точного прогнозирования вирулентности штаммов на основе молекулярно-генетических признаков были рассмотрены капсульные типы K1 и K2, типы последовательностей сидерофора иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16*, тип последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и ген синтеза сидерофора сальмохелина *iroB*. Зависимость ранга штамма от степени вирулентности представлена на точечной диаграмме на рис. 5.

Для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* биологическим методом используют экспериментальную инфекционную модель на белых аутбредных мышах. При

оценке изолятов на модели инфицирования мышей были выявлены три группы штаммов в зависимости от величины летальной дозы: гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ).

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* наиболее часто относят к следующим сиквенс-типам: ST57, ST23 (ассоциированы с K1), ST380, ST375 и ST86 (ассоциированы с K2) [16]. В литературных источниках описаны также типы ST420, ST268, ST65, ST11, ST218, ST412 [17–21].

Сиквенс-тип *K. pneumoniae* ST395 не признан клоном высокого риска [22], однако в статье I.Lazareva et al. [23] изоляты ST395/K2, содержащие *rmpA*, *rmpA2*, *peg-344*, аэробактин, энтеробактин, иерсиниабактин, фимбрии типа I, проявляли максимальную вирулентность в анализе летальности у мышей ($LD_{50} = 10^2$ КОЕ/животное). По результатам проведенного нами исследования два изолята ST395/K2 относились к гипервирулентным, два – к вирулентным и один был авирулентным. Это можно объяснить отсутствием в геноме авирулентного штамма генов синтеза сидерофоров аэробактина (*iucA*) и иерсиниабактина (*ybt16*). Таким образом, штаммы *K. pneumoniae* типа ST395 могут являться гипервирулентными.

Изолят *K. pneumoniae* ST11/K24, сиквенс-тип которого обычно относят к гипервирулентным, по результатам нашего эксперимента не вызывал гибель животных, т.е. являлся авирулентным. В работе T.C.Wang et al. [24] по изучению вирулентности на мышах было показано, что все исследованные изоляты сиквенс-типа ST11 были не способны вызывать гибель мышей.

В исследовании J.Zhao et al. [24] анализ вирулентности изолятов *K. pneumoniae* на мышах показал следующий порядок возрастания средних значений LD_{50} : ST23 < ST86 < ST65 < другие ST (ST412, ST35, ST36, ST309 и ST1107). Авторы заключают, что различные типы ST можно использовать для прогнозирования уровня вирулентности у мышей. В работе A.I.Lev et al. [25] было показано, что два штамма клебсиелл ST23/K57 являлись авирулентными. По результатам нашего исследования все штаммы ST23/K57 ($n = 6$) были авирулентными, а изоляты ST23/K1 относились к вирулентным (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ/животное). Таким образом, информация только о сиквенс-типе изолята является недостаточной для предсказания вирулентности на мышинной модели, необходимо также учитывать капсульный тип штамма.

В исследовании C-R.Lee et al. изоляты *K. pneumoniae* с фенотипом гипермукоидности, генами *rmpA* и кластера *iucABCD-iutA* при внутрибрюшинном введении мышам проявляли высокую вирулентность в отношении летальности мышей независимо от типа капсулы [26]. По результатам нашего исследования у 100% высоковирулентных штаммов присутствовал тип последовательности сидерофора аэробактина (*iuc1*) и гены регуляторов мукоидного фенотипа *rmpA*, *rmpA2*, а также гены *wzyK2* и *peg-344*. Однако большинство из этих признаков встречалось и у авирулентных штаммов: *iuc1* – у 71,4% штаммов, *peg-344* – у 85,7%, *rmpA* и *rmpA2* – у 78,5 и 92,9% штаммов соответственно. Таким образом, достоверно связан с вирулентностью только ген *wzyK2* ($p = 0,0084$).

Среди сидерофоров, секретируемых *K. pneumoniae*, аэробактерин считается наиболее важным фактором вирулентности [27, 28], поскольку может вызывать тяжелую инфекцию, способствуя транспортировке микроорганизмов из кишечного тракта в различные ткани, а также их размножению [29]. По результатам нашего исследования только ген *iucA* аэробактерина был достоверно связан с вирулентностью ($p = 0,0042$), в то время как ген *iutA* ($p = 0,2092$), типы последовательностей *iuc1* ($p = 0,1123$) и *iuc2* ($p = 0,4666$) не были достоверно связаны с вирулентностью.

Гипермукоидный фенотип был характерен для 83,3% штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к гипервирулентным. Авирулентные штаммы в 35,7% случаев обладали гипермукоидным фенотипом. Следовательно, гипервирулентность не следует определять, основываясь только на результатах стринг-теста. Некоторые работы предполагают, что присутствие самих серотипов K1/K2, а не гиперкапсулы, отвечает за повышенную вирулентность, поскольку типичные штаммы K1/K2, продуцирующие капсулы, не менее вирулентны, чем продуцирующие гиперкапсулы K1/K2 штаммы [30]. Данные предположения согласуются с результатами нашего эксперимента: все гипервирулентные и вирулентные штаммы принадлежали к серотипам K2 или K1, но не для всех были характерны гиперкапсула и положительный стринг-тест.

Заключение

В результате работы были исследованы штаммы *K. pneumoniae* ($n = 30$). На основании биопробы на мышцах все штаммы были отнесены к трем группам: гипервирулентные ($n = 6$), вирулентные ($n = 10$) и авирулентные ($n = 14$). Вирулентность была подтверждена высевом исследуемого микроорганизма из паренхиматозных органов и крови погибших животных, а также по результатам патоморфологического исследования.

На основании статистической обработки данных молекулярно-генетического исследования штаммов было выявлено, что одиночные признаки обладают меньшей чувствительностью и специфичностью, чем совокупность признаков. Несмотря на то, что стринг-тест обладал высокой достоверностью ($p = 0,0044$), чувствительность и специфичность данного теста относительно невысокие (87,5 и 64,3% соответственно). Наибольшие чувствительность и специфичность были выявлены для совокупности признаков капсульных типов K1 и K2, типов последовательностей сидерофора иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16*, типов последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и гена синтеза сидерофора сальмохелина *iroB* – 100 и 92,8% соответственно. Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на определении капсульных типов K1 и K2, составила 100%, специфичность – 85,7%.

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 interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Fung CP, Chang FY, Lee SC, Hu BS, Kuo BI, Liu CY, et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? Gut. 2002;50(3):420-4. DOI: 10.1136/gut.50.3.420
2. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Keynan Y, et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(6):981-9. DOI: 10.1007/s10096-011-1396-6
3. Kawai T. Hypermucoviscosity: an extremely sticky phenotype of *Klebsiella pneumoniae* associated with emerging destructive tissue abscess syndrome. Clin Infect Dis. 2006;42(10):1359-61. DOI: 10.1086/503429
4. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY, et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: Association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. J Intern Med. 2006;259(6):606-14. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x
5. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine. J Intern Med. 2020;287(3):283-300. DOI: 10.1111/joim.13007
6. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. Microb Genom. 2018 Sep;4(9):e000196. DOI: 10.1099/mgen.0.000196
7. Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. Gene. 2004;337:189-98. DOI: 10.1016/j.gene.2004.05.008
8. Catalan-Najera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? Virulence. 2017;8(7):1111-23. DOI: 10.1080/21505594.2017.1317412
9. Regueiro V, Campos MA, Pons J, Alberti S, Bengoechea JA. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. Microbiology. 2006;152(Pt 2):555-66. DOI: 10.1099/mic.0.28285-0
10. Togawa A, Toh H, Onozawa K, Yoshimura M, Tokushige C, Shimono N, et al. Influence of the bacterial phenotypes on the clinical manifestations in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia patients: A retrospective cohort study. J Infect Chemother. 2015;21(7):531-7. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.04.004
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries. ECDC, Stockholm. 2021.
12. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, et al. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Infect Immun. 2021;89(4):e00693-20. DOI: 10.1128/IAI.00693-20
13. Joseph L, Meërciecca T, Forestier C, Balestrino D, Miquel S. From *Klebsiella pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. Microorganisms. 2021;9(6):1282. DOI: 10.3390/microorganisms9061282
14. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* Infection Biology: Living to Counteract Host Defences. FEMS Microbiol. Rev. 2019;43(2):123-44. DOI: 10.1093/femsre/fuy043
15. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Наука, 1962. / Ashmarin IP, Vorob'ev AA. Statistical methods in microbiological research. L.: Nauka Publ., 1962. (In Russian).

16. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. Virulence. 2013;4(2):107-18. DOI: 10.4161/viru.22718
17. Zhao J, Chen J, Zhao M, Qiu X, Chen X, Zhang W, et al. Multilocus Sequence Types and Virulence Determinants of Hypermucoviscosity-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Community-Acquired Infection Cases in Harbin, North China. Jpn J Infect Dis. 2016;69(5):357-60. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.321
18. Du P, Zhang Y, Chen C. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis. 2018;18(1):23-24. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30625-4
19. Eger E, Heiden SE, Becker K, Rau A, Geisenhainer K, Idelevich EA, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 420 with a Chromosomally Inserted Virulence Plasmid. Int J Mol Sci. 2021;22(17):9196. DOI: 10.3390/ijms22179196.
20. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2019;18(1):4. DOI: 10.1186/s12941-018-0302-9
21. Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Sepehr A, et al. Molecular epidemiology of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. Iran J Microbiol. 2021;13(3):257-65. DOI: 10.18502/ijm.v13i3.6384
22. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344-59. DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1
23. Lazareva I, Ageevets V, Sopova J, Lebedeva M, Starkova P, Likholetova D, et al. The emergence of hypervirulent *bla_{NDM-1}*-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital. Infect Genet Evol. 2020 Nov;85:104527. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104527
24. Wang TC, Lin JC, Chang JC, Hiaso YW, Wang CH, Chiu SK, et al. Virulence among different types of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with multi-locus sequence type (MLST)-11, Serotype K1 or K2 strains. Gut Pathog. 2021;13(1):40. DOI: 10.1186/s13099-021-00439-z
25. Lev AI, Astashkin EI, Kislichkina AA, Solovieva EV, Kombarova TI, Korobova OV, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. Path. Global Health. 2018;112(3):142-51. DOI: 10.1080/20477724.2018.1460949
26. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017;7:483. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00483
27. Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2014;82(6):2356-67. DOI: 10.1128/IAI.01667-13
28. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *ex vivo* and *in vivo*. Infect Immun. 2015;83(8):3325-33. DOI: 10.1128/IAI.00430-15
29. Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2020;19(1):1. DOI: 10.1186/s12941-019-0343-8
30. Lin JC, Chang FY, Fung CP, Xu JZ, Cheng HP, Wang JJ, et al. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. Microbes Infect. 2004;6(13):1191-8. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.06.003

Информация о соавторах:

Самойлова Анна Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Лихачев Иван Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Михайлов Николай Венерович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», доцент кафедры микробиологии и вирусологии института медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Минздрава России

Светлов Даниил Дмитриевич, лаборант-исследователь лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Information about co-authors:

Anna A. Samoilova, Junior Researcher, laboratory of biological products, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Ivan V. Likhachev, Junior Researcher, laboratory of biological products, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Nikolay V. Mikhailov, MD, PhD, senior researcher at the laboratory of biological products Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; associate professor, department of microbiology and virology, institute of medical education, V.A.Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Daniil D. Svetlov, laboratory assistant, laboratory of biological products, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

НОВОСТИ НАУКИ**Пептиды, полученные на основе кунжутного белка перспективны в борьбе с *E. coli* и *S. aureus***

Точное обнаружение пептидов с антимикробными свойствами может быть ускорено с помощью вычислительного скрининга. В данном исследовании были исследованы и синтезированы два антимикробных пептида: AlaGly-Gly-Val-Pro-Arg и Ser-Thr-Ile-Arg, которые являются нетоксичными, стабильными и неаллергенными. Кроме того, пептиды были получены из семян кунжута, что дает большой потенциал для дальнейших исследований и разработок.

Эксперименты *in vitro* подтвердили антибактериальные свойства пептидов. На взаимодействие между пептидами кунжута и DHPS влияло несколько факторов, включая гидрофобные взаимодействия, водородные связи, силы взаимодействия притяжения заряда и силы Ван-дер-Ваальса. Использование AlaGly-Gly-Val-Pro-Arg или Ser-Thr-Ile-Arg приводило к подавлению как *E. coli*, так и *S. aureus*.

Zhu Z, Pan F, Wang O, Zhao L, Zhao L.

Antibacterial Effect of Sesame Protein-Derived Peptides against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: *In Silico* and *In Vitro* Analysis. *Nutrients*. 2024 Jan 4;16(1):175. DOI: 10.3390/nu16010175

Эталонные линии штаммов *Vibrio cholerae* для производства «Вакцины холерной бивалентной химической»

О.В.Громова, О.С.Дуракова, С.А.Воробьева, А.В.Гаева, Н.И.Белякова, Я.М.Краснов,
О.А.Лобовикова, О.А.Волох

ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Для производства вакцины холерной бивалентной химической используются природные токсигенные штаммы-продуценты ее специфических компонентов *V. cholerae* 569B и *V. cholerae* M-41.

Целью работы была проверка стабильности культурально-морфологических, биохимических, серологических, иммуногенных, вирулентных и токсигенных свойств штаммов-продуцентов холерной вакцины в производственных условиях.

Материалы и методы. На основе комплексных исследований современными методами (атомно-силовая микроскопия и трансмиссионная электронная микроскопия, полногеномное секвенирование, дот-иммуноанализ, радиальный пассивный иммунный гемолиз) получены новые информативные характеристики культурально-морфологических свойств и показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *V. cholerae* 569B и M-41.

Результаты. Исследованные эталонные линии штаммов *V. cholerae* 569B (KM2129) и M-41 (KM2130) депонированы в Государственную коллекцию ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, химическая холерная вакцина, штаммы-продуценты, полногеномное секвенирование

Для цитирования: Громова О.В., Дуракова О.С., Воробьева С.А., Гаева А.В., Белякова Н.И., Краснов Я.М., Лобовикова О.А., Волох О.А. Эталонные линии штаммов *Vibrio cholerae* для производства «Вакцины холерной бивалентной химической». Бактериология. 2024; 9(2): 29–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-29-34

Reference lineages of *Vibrio cholerae* strains for the production of “Chemical Bivalent Cholera Vaccine”

O.V.Gromova, O.S.Durakova, S.A.Vorobeveva, A.V.Gaeva, N.I.Belyakova, Ya.M.Krasnov,
O.A.Lobovikova, O.A.Volokh

Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Strains *V. cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41 are natural toxigenic strains producing specific components of the bivalent chemical cholera vaccine.

The purpose of the work was to test the stability of the cultural-morphological, biochemical, serological, immunogenic, virulent and toxigenic properties of cholera vaccine-producing strains under production conditions.

Materials and methods. Based on complex studies using modern methods (atomic force microscopy and transmission electron microscopy, whole-genome sequencing, dot-immunoassay, radial passive immune hemolysis), new informative characteristics of cultural and morphological properties were obtained and the stability of nucleotide sequences of the complete genome of *V. cholerae* strains 569B and M was shown -41.

Results. The studied reference lines of *V. cholerae* strains 569B (KM2129) and M-41 (KM2130) were deposited in the State Collection of the FSSI Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор.

Key words: *Vibrio cholerae*, chemical cholera vaccine, producer strains, whole genome sequencing

For citation: Gromova O.V., Durakova O.S., Vorobeveva S.A., Gaeva A.V., Belyakova N.I., Krasnov Ya.M., Lobovikova O.A., Volokh O.A. Reference lineages of *Vibrio cholerae* strains for the production of “Chemical Bivalent Cholera Vaccine”. Bacteriology. 2024; 9(2): 29–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-29-34

Для корреспонденции:

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 26-2131

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 20.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Olga V. Gromova, PhD, MD, senior researcher at the Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 26-2131

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 20.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

В связи с высоким уровнем заболеваемости холерой в мире [1, 2] и угрозой заноса инфекции из эндемичных стран потребность в эффективной вакцине против холеры чрезвычайно актуальна [3–5]. В Российской Федерации (РФ) разработана и выпускается «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», производства ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора [5–7].

Производство вакцин является сложным, длительным процессом и осуществляется в соответствии с требованиями «Правил надлежащей производственной практики» (GMP), утвержденными приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 4.06.2013 №916 (ред. от 18.12.2015), и Государственной Фармакопеи (ГФ) РФ XIV [8–10]. Данные нормативные документы включают комплекс требований к производству и контролю качества иммунологических лекарственных препаратов. Производство вакцин предусматривает обязательный поэтапный контроль на разных стадиях технологического процесса, включая контроль исходного сырья, полуфабриката и готовой лекарственной формы [11].

Одним из ключевых требований к штаммам-продуцентам, используемым в производстве иммунологических препаратов, является их стабильность, которая заключается в сохранении основных культурально-морфологических, физиологических и продуктивных свойств в условиях производственного цикла [ГФ РФ XIV, 2018]. Штаммы *Vibrio cholerae* 569В серовара Инаба и *V. cholerae* М41 серовара Огава с 1995 г. используются на этапе получения антигенов холерного вибриона, сохраняя свои основные культурально-морфологические свойства, физиологические и продуктивные параметры, но с учетом возможностей современных технологий, включающих методы оценки молекулярно-генетических структур (полногеномное секвенирование, полимеразная цепная реакция (ПЦР)) и целого ряда морфометрических характеристик, представляет интерес и будет информативным применением современных методов для оценки штаммов-продуцентов [12–15]. Следует отметить перспективность применения для характеристики производственных штаммов таких методов, как атомно-силовая и трансмиссионная микроскопия, так как факторы окружающей среды могут привести к изменению поверхностных структур клетки [13, 14].

Штаммы *V. cholerae* O1, используемые в производстве химической холерной вакцины, должны иметь типичные культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства; обладать холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами [16]. Согласно промышленному регламенту, для оценки свойств производственных штаммов используют комплекс тестов *in vivo* и *in vitro*.

В настоящее время для совершенствования подходов по верификации вакцинных штаммов в процессе длительного хранения для определения их генетической стабильности представляется перспективным использование полногеномного секвенирования. Полногеномное секвенирование дает информацию о последовательности и структуре всего генома исследуемых штаммов и может быть использовано для подтверждения подлинности и оценки стабильности. В работе Л.В.Саяпиной с соавт. [17], посвященной изучению ста-

бильности вакцинного штамма туляремийного микроба, было отмечено, что в настоящее время в нормативных документах отсутствуют требования к генетической стабильности штаммов-продуцентов. Авторы считают, что использование полногеномного секвенирования позволит в полной мере оценить изменения в геноме вакцинного штамма и определить его аутентичность в процессе хранения в лиофилизированном состоянии, при анимализации и подготовке последующей серии вакцинного штамма.

Е.В.Острашевской с соавт. [18] были проведены полногеномное секвенирование и последующий сравнительный анализ образцов субштамма *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) от рабочего банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также производственных серий вакцины БЦЖ. Авторы отмечают, что стабильность генома субштамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель – сохранение эталонных линий штаммов-продуцентов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 с характерными свойствами для обеспечения производства вакцины.

Материалы и методы

Культуральные свойства штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 изучали в посевах на бульоне и на агаре Хоттингера (рН 7,6 ± 0,1) после 19 ± 1 ч инкубации при температуре 37 ± 1°C. Биохимические свойства штаммов *V. cholerae* определяли с использованием «Набора для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных бактерий API 20E» (BioMerieux, Франция). Серологические свойства проверяли в реакции агглютинации (РА) с сыворотками диагностическими: холерной O1 адсорбированной сухой для РА (ТУ 8938-009-01898109-2007), холерными Огава и Инаба адсорбированными сухими для РА (ТУ 8938-010-0189109-2007), холерной RO адсорбированной сухой для РА (ТУ 8938-011-0898109-2007). Иммуногенные свойства штаммов проверяли на белых нелинейных мышцах массой 11 ± 1 г смешанного поголовья. Вирулентные свойства штамма *V. cholerae* 569В изучали путем внутрикишечного заражения кроликов-сосунков. Содержание животных и манипуляции проводили в соответствии с Директивой №2010/63/ЕС Европейского парламента Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» (СПб.; 2010). Протоколы исследований одобрены комиссией по биоэтике «Российского противочумного института «Микроб».

Токсигенные свойства штамма *V. cholerae*. Через 19 ± 1 ч инкубации при температуре 37 ± 1°C колонии штамма 569В изучали на:

- присутствие в хромосоме гена *ctxA* с помощью тест-системы для выделения ДНК *V. cholerae* (*ctxA+*) методом ПЦР (ГенХол) – проводили согласно инструкции к тест-системе;
- способность продуцировать токсин во внешнюю среду в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) на чашках с агаром Хоттингера (рН 7,7 ± 0,1) и синказной средой [19].

Морфологию клеток контролировали методами световой (окрашивание мазков по Граму) и электронной просве-

Таблица 1. Праймеры, используемые в лабораторном испытании
 Table 1. Primers used in laboratory testing

Ген / Gene	Название праймера / Primer name	Последовательность праймера (5' – 3') / Primer sequence (5' – 3')	Длина амплифицируемого фрагмента, п.н. / Length of amplified fragment, bp.	Источник / Reference
<i>ctxB</i>	<i>ctxB-F</i>	GGGAATGCTCCAAGATCATCGATGAGTAATAC	600	Brumfield K.D. et al., 2018
	<i>ctxB-R</i>	CATCATCGAACCACAAAAAGCTTACTGAGG		
<i>wbe</i> (<i>rfb</i>)	<i>wbe-F</i>	CCCCGAAAACCTAATGTGAG	638	Goel A.K. et al., 2007
	<i>wbe-R</i>	TCTATGTGCTGCGATTGGTG		

чивающей (методом негативного контрастирования) микроскопии (ТЭМ). С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) методами полуконтактным и рассогласования измеряли морфометрические параметры бактериальной клетки и оценивали шероховатость поверхности клеточной стенки.

Исследования проводили на просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit TWIN (120kV) (Чехия) и сканирующем зондовом микроскопе Solver P47 PRO (NT-MDT, Россия) с использованием кремниевых кантилеверов серии NSG01, обладающих резонансной частотой 120 кГц и константой жесткости 5,5 Н/м. Сканирование выполнялось в режиме прерывистого контакта следующими методами: полуконтактным и рассогласования. Обработку изображений проводили с помощью встроенного программного обеспечения Nova.

Специфическую активность холерного токсина и О-антигена определяли методом непрямого дот-иммуноанализа с конъюгатом на основе белка А, меченного золотыми наночастицами (ДИА ЗНЧ) [20].

Анализ штаммов на присутствие в хромосоме гена *ctxA* проводили с использованием тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae* (*ctxA*+) (ГенХол) (ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб») методом ПЦР.

Присутствие генов *ctxB* и *wbe* (*rfb*) у штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 определяли с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в табл. 1.

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1–2%-м агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл этидия бромида с последующим просмотром геля в ультрафиолетовом свете. Оценка результатов проводилась при их сравнении с положительным контролем. В качестве такового для ПЦР на гены *ctxA* и *ctxB* использовали водный раствор ДНК *V. cholerae* 569В, для гена *wbe* (*rfb*) – водный раствор ДНК *V. cholerae* М-41.

Для приготовления образца для ПЦР клетки ночных культур ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора до концентрации 10⁷. Подготовку проб проводили в соответствии с МУ1.3.2569-09. Полногеномное секвенирование образцов штаммов *V. cholerae* 569В и М-41, отобранных на разных этапах культивирования, проводили на платформе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием чипа Ion 318 Chip Kit и набора реагентов Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Покрытие нуклеотидной последовательности генома, исследуемого на каждом из этапов культивирования штаммов, составило от ×54 до ×102. Сборку единичных прочтений (ридов) проводили с помощью программы Newbler 2.6 (Roche, Швейцария).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований было показано, что производственные штаммы *V. cholerae* 569В и М-41 на всех этапах культивирования были типичными для S-формы по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам. Штаммы обладали вирулентными, токсигенными и иммуногенными свойствами (табл. 2).

В предыдущей работе нами был проведен комплексный анализ стабильности штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 в следующих пробах: I генерации (19-часовые культуры штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 на плотной питательной среде); II генерации (6-часовые бульонные культуры); III генерации (17-часовая бульонная культура); 5 ч (экспоненциальная фаза роста) и 10 ч (стационарная фаза роста) культивирования в биореакторе [21].

В результате показано, что оба штамма на всех этапах культивирования по культуральным свойствам являлись типичными для S-формы, диссоциация не отмечалась. Методом световой микроскопии при окрашивании по Граму отмечена типичность формы бактерий во всех исследованных пробах.

Методом АСМ было определено, что морфометрические показатели микробных клеток штамма *V. cholerae* М-41 оставались практически неизменными в I–IV генерациях и составляли в среднем по следующим показателям: длина – 2,05 ± 0,1 мкм, ширина – 0,64 ± 0,05 мкм, высота – 0,26 ± 0,03 мкм. Для штамма *V. cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования к 10-му часу клетки в среднем изменили свои линейные размеры в сторону увеличения длины (с 2,4 ± 0,1 мкм до 3,51 ± 0,2 мкм). При этом высота (0,255 ± 0,02 мкм) и ширина (0,7 ± 0,03 мкм) в среднем не изменились. Шероховатость клеточной стенки у обоих штаммов оставалась практически неизменной, что косвенно свидетельствует о стабильности поверхностных структур бактерий. Методом ТЭМ на всех этапах четко визуализировались типичные вибрионы. В условиях глубинного культивирования в биореакторе и наличии оптимальных условий в среде выращивания (температура, рН, подкормка раствором глюкозы) к 10 ч культивирования у клеток визуализировался жгутик, независимо от штамма.

Во всех исследованных пробах методом ПЦР были выявлены фрагменты ДНК, свидетельствующие о наличии полноценного гена *ctxA*, что свидетельствует о стабильности производственных штаммов по показателю «токсигенность», *ctxB* – о продукции иммуногенной В-субъединицы холерного токсина, *wbe* (*rfb*) – о продукции О-антигена. При постановке РПИГ вокруг макроколоний штамма *V. cholerae* 569В наблюдалась зона иммунного гемолиза 3,5 ± 0,5 мм, при требованиях НД 2–4 мм, что свидетельствует о способности штамма продуцировать токсин во внешнюю среду.

Таблица 2. Иммуногенные, вирулентные и токсигенные свойства штаммов
 Table 2. Immunogenic, virulent and toxigenic properties of strains

Штамм <i>V. cholerae</i> / Strain <i>V. cholerae</i>	Иммуногенность (на белых беспородных мышах) / Immunogenicity (on white mongrel mice)		Вирулентные свойства (холерогенность на кроликах-сосунках) / Virulent properties (cholero-genicity on suckling rabbits)	
	Требования НД / ND requirements	Фактически (заражающий штамм) / Actually (infecting strain)	Требования НД / ND requirements	Фактически / Actually
569B	ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ м.к. / ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ m.c.	ED ₅₀ = 4,22•10 ⁶ м.к. (<i>V. cholerae</i> P-3122) / ED ₅₀ = 5,62•10 ⁵ м.к. (<i>V. cholerae</i> M-879)	Накопление жидкости в толстом кишечнике 9 ± 1 дневных кроликов- сосунков в дозе 10 ² и 10 ³ м.к. / Accumulation of fluid in the large intestine of 9 ± 1 day-old suckling rabbits at a dose of 10 ² and 10 ³ m.c.	На каждую дозу по 3 кролика-сосунка. У всех кроликов выражен синдром холерогенности / 3 suckling rabbits for each dose. All rabbits exhibit cholero-genic syndrome
M-41	ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ м.к. / ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ m.c.	ED ₅₀ = 3,16•10 ⁵ м.к. (<i>V. cholerae</i> P-3122) ED ₅₀ = 2,37•10 ⁶ м.к. (<i>V. cholerae</i> M-879)	Накопление жидкости в толстом кишечнике 9 ± 1 дневных крольчат в дозе 10 ⁵ и 10 ⁷ м.к. / Accumulation of fluid in the large intestine of (9 ± 1) day-old rabbits at a dose of 10 ⁵ m.c. 10 ⁷ m.c.	На каждую дозу по 3 кролика-сосунка. У всех кроликов выражен синдром холерогенности / 3 suckling rabbits for each dose. All rabbits exhibit cholero-genic syndrome

Иммунохимические свойства штаммов были изучены разработанным нами методом непрямого ДИА ЗНЧ. В образцах штамма *V. cholerae* 569B специфическая активность холерного токсина и О-антигена Инаба в ДИА ЗНЧ составляла в среднем 1:8. Специфическая активность О-антигена Огава штамма *V. cholerae* М-41 в ДИА ЗНЧ также составляла 1:8.

На данный момент современные технологии открывают новые возможности исследований молекулярно-генетической структуры штаммов *V. cholerae*. Методом полногеномного секвенирования была исследована структура ДНК холерного вибриона на этапах культивирования. В табл. 3 приведены названия профагов, островов патогенности, генов и локусов, идентичность нуклеотидной последовательности которых на этапах производственного цикла культивирования штаммов *V. cholerae* М-41 и 569В проверялась в первую очередь.

Сравнительный анализ собранных нуклеотидных последовательностей полного генома штамма *V. cholerae* М-41, полученных для клеток, отобранных на начальном, промежуточном и финальном этапе производственного цикла культивирования штамма *V. cholerae* М-41, показал полную идентичность этих секвенированных геномов. Аналогично сравнение секвенированных образцов штамма *V. cholerae* 569В, полученных

для клеток, отобранных на разных стадиях производственного цикла, показало полную идентичность этих геномов.

С использованием комплекса методов (АСМ и ТЭМ, полногеномное секвенирование, дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченого коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз) получены новые информативные характеристики культурально-морфологических свойств и показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *V. cholerae* 569В и М-41.

В ГКПБ ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонированы два штамма *V. cholerae* О1 классического биовара серовара Инаба KM2129 (569В) и серовара Огава KM2130 (М-41) как производственные линии природных штаммов, используемых для изготовления иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая».

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Таблица 3. Сравнительная характеристика данных полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae* 569В и М-41
 Table 3. Comparative characteristics of whole-genome sequencing data of *V. cholerae* strains 569B and M-41

Штамм, этап отбора клеток при культивировании <i>V. Cholerae</i> / Strain, stage of cell selection during cultivation of <i>V. cholerae</i>	Профайг / Prophage		Остров патогенности / Island of pathogenicity		Гены / Genes			Биосинтез антигена / Biosynthesis of antigens
	CTXφ (ctxA, ctxB1)	RSI (rstR classical)	VPI-I	VPI-II	ToxT	ToxR	ToxS	локус O1 (wbe)*
569B, I генерация / I generation	+	+	+	+	+	+	-	+
569B, II генерация / II generation	+	+	+	+	+	+	-	+
569B, III генерация / III generation	+	+	+	+	+	+	-	+
569B, IV генерация / IV generation	+	+	+	+	+	+	-	+
M-41, I генерация / I generation	+	+	+	+	+	+	+	+
M-41, II генерация / II generation	+	+	+	+	+	+	+	+
M-41, III генерация / III generation	+	+	+	+	+	+	+	+
M-41, IV генерация / IV generation	+	+	+	+	+	+	+	+

*Локус, содержащий необходимые для биосинтеза антигена O1 гены, расположенные между фланкирующими генами *gmhD* и *rjg* [Seed K.D. et al., 2012]. /
 *Locus containing genes necessary for the biosynthesis of the O1 antigen, located between the flanking genes *gmhD* and *rjg* [Seed K.D. et al., 2012].

Токсигенные свойства / <i>Toxigenic properties</i>		Реакция пассивного иммунного гемолиза / <i>Passive immune hemolysis reaction</i>	
ПЦР с «Тест-системой для выявления ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+) методом ПЦР (ГенХол)» <i>PCR with "Test system for detecting DNA of V. cholerae (ctxA+) by polymerase chain reaction (GenHol)"</i>	Фактически / <i>Actually</i>	Требования НД / <i>ND requirements</i>	Фактически / <i>Actually</i>
Требования НД / <i>ND requirements</i>	Фактически / <i>Actually</i>	Требования НД / <i>ND requirements</i>	Фактически / <i>Actually</i>
Присутствие в хромосоме гена <i>ctxA</i> / <i>Presence of the ctxA gene on the chromosome</i>	Ген <i>ctxA+</i> присутствует / <i>ctxA+ gene is present</i>	Зона пассивного иммунного гемолиза – 2-4 мм / <i>Zone of passive immune hemolysis – 2-4 mm</i>	Зона пассивного иммунного гемолиза – 3,5 мм / <i>Zone of passive immune hemolysis – 3.5 mm</i>
Присутствие в хромосоме гена <i>ctxA</i> / <i>Presence of the ctxA gene on the chromosome</i>	Ген <i>ctxA+</i> присутствует / <i>ctxA+ gene is present</i>	–	–

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. Geneva: WHO. 2020;96(37):445-454.
- WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (accessed 30.03.2023).
- Беспалова ИА, Иванова ИА, Омельченко НД, Филиппенко АВ, Труфанова АА. Современное состояние специфической профилактики холеры. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018;17(1):55-61.
- Носков АК, Кругликов ВД, Москвитина ЭА, Миронова ЛВ, Монахова ЕВ, Соболева ЕГ, и др. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;1:56-66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-6
- Онищенко ГГ, Попова АЮ, Кутырев ВВ, Смирнова НИ, Щербакоева СА, Москвитина ЭА, и др. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016;1:89-101.
- Джапаридзе МН, Наумов АВ, Мелещенко МВ, Никитина ГП. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент №2076734 РФ, МПК А61К 39/00, А61К 35/76; 1993.
- Анисимов ПИ, Адамов АК, Джапаридзе МН, Никитина ГП. Способ производства вакцины для профилактики холеры. Патент № 2080121 РФ, МПК А61К39/00; 1997.
- Приказ от 6.12.2021 г. №1122н об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемиологическим показателям и порядка проведения профилактических прививок. Министерство здравоохранения Российской Федерации. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/727605537?marker=65201M> (дата обращения 31.05.2022).
- Решение от 3.11.2016 №77 об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Совет Евразийской экономической комиссии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://svsps.gov.ru/sites/default/files/npafiles/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf (дата обращения 22.12.2022).
- Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. М.: ФЭМБ, 2018.
- Медуницын НВ. Государственная система оценки безопасности вакцин. Инф. бюл. Вакцинация. 2000;8(2):3-4.
- Челдышова НБ, Крицкий АА, Краснов ЯМ, Смирнова НИ. Анализ результатов фрагментарного и полногеномного секвенирования атипичных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, вызвавших вспышку азиатской холеры в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015;5(20):24-31.
- Ерохин ПС, Уткин ДВ, Осина НА, Бойко АВ, Кузнецов АС, Куклев ВЕ, и др. Современное состояние изучения ультраструктуры поверхности клеточной стенки микроорганизмов в условиях неблагоприятного воздействия факторов биотической и абиотической природы методами атомно-силовой микроскопии. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2016;16(2):186-189.
- Уткин ДВ, Кузнецов ОС, Ерохин ПС, Спицын АН, Волох ОА, Осина НА. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии. Проблемы особо опасных инфекций. 2012;2(112):62-64.
- Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug;54(8):3132-42. DOI: 10.1128/AAC.00124-10
- ФС.3.3.1.0020.15 Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). М.: ФЭМБ. 2018;5326-5336.
- Саяпина ЛВ, Осина НА, Нарышкина НА, Федоров АВ, Краснов ЯМ, Давыдов ДС, и др. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;3:137-144. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144
- Острашевская ЕВ, Винокурова ЕА, Шитиков ЕА. Изучение генетической стабильности субштамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018;2:58-67. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-2-58-67
- Шагинян ИА, Маракуша БН. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолabileльных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1983;2:92-96.
- Дуракова ОС, Громова ОВ, Киреев МН, Воробьева СА, Клокова ОД, Ливанова ЛФ, и др. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической актив-

ности антигенов в производстве холерной вакцины. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(4):10-3.

21. Дуракова ОС, Воробьева СА, Гаева АВ, Краснов ЯМ, Кузнецов ОС, Ерохин ПС, и др. Изучение стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;2:70-74. DOI:10.21055/0370-1069-2022-2-70-74.

References

1. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. Geneva: WHO, 2020;96(37):445-454.
2. WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (accessed 30.03.2023).
3. Bepalova IA, Ivanova IA, Omel'chenko ND, Filippenko AV, Trufanova AA. Current state of specific cholera prophylaxis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018;17(1):55-61. (In Russian).
4. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Mironova LV, Monakhova EV, Soboleva EG, et al. Cholera: analysis and assessment of epidemiological situation around the world and in Russia (2013–2022). Forecast for 2023. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2023;1:56-66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-66 (In Russian)
5. Onishchenko GG, Popova AYU, Kutryev VV, Smirnova NI, Shcherbakova SA, Moskvitina EA, et al. Relevant problems of epidemiological surveillance, laboratory diagnostics and prevention of cholera in the Russian Federation. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2016;1:89-101. (In Russian).
6. Dzhaparidze MN, Naumov AV, Meleshchenko MV, Nikitina GP. A method for the production of oral chemical vaccine. Patent No 2076734 of the Russian Federation, IPC A61K 39/00, A61K 35/76; 1993. (In Russian).
7. Anisimov PI, Adamov AK, Dzhaparidze MN, Nikitina GP. Method for the production of a vaccine for the prevention of cholera. RF Patent No 2080121, IPC A61K39/00; 1997. (In Russian).
8. Order No. 1122n dated 6 Dec 2021 On the approval of the national calendar of preventive vaccinations, the calendar of preventive vaccinations upon epidemic indications and the procedure for preventive vaccinations. Ministry of Health of the Russian Federation. [Electronic source]. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/t727605537?marker=65201M> (accessed 31 May 2022). (In Russian).
9. Decision No 77 dated 3 Nov 2016 On the approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union. Council of the Eurasian Economic Commission. [Electronic source]. Available at: https://svsps.gov.ru/sites/default/files/npafiles/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf (accessed 22 Dec 2022) (In Russian).
10. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Moscow: FEML, 2018. (In Russian).
11. Medunitsyn NV. State Vaccine Safety Assessment System. Inf. byul. Vaccination. 2000;8(2):3-4. (In Russian).
12. Cheldyshova NB, Kritsky AA, Krasnov YaM, Smirnova NI. Analysis of the results of fragmentary and genome-wide sequencing of atypical *Vibrio cholerae* strains of the classical biovar that caused the outbreak of Asian cholera in Russia. Epidemiology and Infectious Diseases. 2015;5(20):24-31. (In Russian).
13. Erokhin PS, Utkin DV, Osina NA, Boiko AV, Kuznetsov AS, Kuklev VE, et al. The current state of studying the ultrastructure of the cell wall surface of microorganisms under the adverse effects of factors of biotic and abiotic nature using atomic force microscopy. News of the Saratov University. A New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology. 2016;16(2):186-189. (In Russian).
14. Utkin DV, Kuznetsov OS, Erokhin PS, Spitsyn AN, Volokh OA, Osina NA. Development of Methodological Approaches for Examination of Particularly Dangerous Infectious Diseases Agents by Means of Atomic Power Microscopy. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2012;2(112):62-64. (In Russian).

15. Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug;54(8):3132-42. DOI: 10.1128/AAC.00124-10
16. FS.3.3.1.0020.15 Chemical bivalent cholera vaccine, tablets coated with an intestinal-soluble coating. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition (Volume II). M.: FEMB. 2018;5326-5336. (In Russian).
17. Sayapina LV, Osina NA, Naryshkina NA, Fedorov AV, Krasnov YaM, Davydov DS, et al. Improvement of approaches to verification of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG during long-term storage. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;3:137-144. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144 (In Russian).
18. Ostrashevskaya EV, Vinokurova EA, Shitikov EA. Study of the genetic stability of the *M. bovis* BCG-1 sub-strain (Russia) in the process of BCG vaccine production. Journal Microbiol. 2018;2:58-67. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-2-58-67 (In Russian).
19. Shaginyan IA, Marakusha BN. Modification of the method for passive immune hemolysis on a solid medium to detect the production of thermolabile enterotoxins by strains of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1983;2:92-6. (In Russian).
20. Durakova OS, Gromova OV, Kireev MN, Vorobeva SA, Klokova OD, Livanova LF, et al. The use of dot-immunoassay to determine the specific activity of antigens in the production of cholera vaccine. Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov. 2018;14(4):10-3. (In Russian).
21. Durakova OS, Vorobeva SA, Gaeva AV, Krasnov YaM, Kuznetsov OS, Erokhin PS, et al. Investigating the stability of the properties of *Vibrio cholerae* strains – producers of active components of the chemical cholera vaccine. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;2:70-74. DOI:10.21055/0370-1069-2022-2-70-74 (In Russian).

Информация о соавторах:

Дуракова Оксана Сергеевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Воробьева Светлана Александровна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Гаева Анна Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Белякова Нина Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Краснов Ярослав Михайлович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Лобовикова Оксана Анатольевна, кандидат биологических наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Oksana S. Durakova, Researcher, Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Svetlana A. Vorobeva, Junior Researcher, Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Anna V. Gaeva, PhD in Biological Sciences, Researcher at the Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Nina I. Belyakova, PhD, MD, Senior Researcher at the Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Yaroslav M. Krasnov, PhD in Chemical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Oksana A. Lobovikova, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Biological and Technical Control, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Oksana A. Volokh, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* классического биовара сероваров Инаба и Огава

С.А.Воробьева, О.В.Громова, М.Н.Киреев, О.А.Волох

ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Одним из важных этапов производства иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» является контроль специфических компонентов по их активности. На сегодняшний день отсутствуют коммерческие наборы для определения содержания серовароспецифичного О-антигена Инаба и Огава холерного вибриона в компонентах и готовой лекарственной форме вакцины. Перспективными представляются иммунохимические методы, основой которых являются специфические гипериммунные сыворотки животных. В работе представлены схемы иммунизации кроликов для получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* сероваров Огава и Инаба классического биовара. Применение хитозана в качестве адъюванта позволило получить гипериммунную сыворотку к О-антигену Инаба со следующими характеристиками: рабочее разведение –1/10, активность с гомологичным О-антигеном –1/1600, активность с гетерологичным О-антигеном –1/80. Использование схемы с внутривенной иммунизацией без использования адъюванта привело к получению активной сыворотки к О-антигену Огава, рабочее разведение –1/50, активность с гомологичным О-антигеном –1/1280, активность с гетерологичным О-антигеном –1/40. Показана возможность определения О-антигенов в готовом препарате вакцины методом дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами с использованием полученных экспериментальных сывороток.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, кроличьи сыворотки, адъюванты, холерная вакцина, глюкановые частицы, хитозановые частицы

Для цитирования: Воробьева С.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Волох О.А. Разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* классического биовара сероваров Инаба и Огава. Бактериология. 2024; 9(2): 35–39. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-35-39

Development of a method for obtaining polyclonal serums for *Vibrio cholerae* O-antigens of the classic biotype serotype Inaba and Ogawa

S.A.Vorobeva, O.V.Gromova, M.N.Kireev, O.A.Volokh

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

One of the important stages of the production of the immunobiological drug "Cholera bivalent chemical vaccine, tablets coated with an intestinal shell" is the control of specific components according to their activity. To date, there are no commercial kits for determining the content of serovarospecific O-antigen Inaba and Ogawa cholera vibrio in the components and finished dosage form of the vaccine. Immunochemical methods based on specific hyperimmune sera of animals are promising. The paper presents the schemes of immunization of rabbits for obtaining polyclonal serums to *Vibrio cholerae* O-antigens of Ogawa and Inaba serovars of the classical biovar. The use of chitosan as an adjuvant made it possible to obtain a hyperimmune serum to the Inaba O-antigen with the following characteristics: working dilution –1/10, activity with homologous O-antigen –1/1600, activity with heterologous O-antigen –1/80. The use of a scheme with intravenous immunization without the use of an adjuvant led to the production of an active serum for Ogawa O-antigen, working dilution –1/50, activity with homologous O-antigen –1/1280, activity with heterologous O-antigen –1/40. The possibility of determining O-antigens in the finished vaccine preparation by dot-immunoassay with gold nanoparticles using the obtained experimental serums is shown.

Key words: *Vibrio cholerae*, rabbit serums, adjuvants, cholera vaccine, glucan particles, chitosan particles

For citation: Vorobeva S.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Volokh O.A. Development of a method for obtaining polyclonal serums for *Vibrio cholerae* O-antigens of the classic biotype serotype Inaba and Ogawa. Bacteriology. 2024; 9(2): 35–39. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-35-39

Для корреспонденции:

Воробьева Светлана Александровна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 26-2131

E-mail: rusrap@microbe.ru

Статья поступила 13.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Svetlana A. Vorobeva, Junior Researcher, laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 26-2131

E-mail: rusrap@microbe.ru

The article was received 13.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

Иммунобиологический лекарственный препарат «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» является единственным зарегистрированным и выпускаемым в России средством для профилактики холеры. Производство вакцины требует постоянного контроля специфических свойств как готовой лекарственной формы, так и компонентов на всех технологических стадиях, который проводится согласно Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ, XV издание) и требованиям «Правил надлежащей производственной практики», утвержденным приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 4.06.2013 №916 (ред. от 18.12.2015), положения которого гармонизированы с руководством Good manufacturing practice (GMP).

Производственный цикл получения вакцины включает в себя контроль активности антигенных компонентов на всех этапах. В состав вакцины входят О-антигены (О-АГ) Инаба и Огава холерного вибриона, которые в настоящее время контролируются в реакции диффузионной преципитации и реакции непрямой гемагглютинации с «Сывороткой диагностической холерной О1 адсорбированной сухой для реакции агглютинации». Данные методы позволяют определять содержание только общего О-АГ без определения серовароспецифичности этого компонента.

Разработка практических методов оценки активности протективных антигенов холерного вибриона при производстве холерной бивалентной химической вакцины остается актуальным направлением. Ранее В.А.Фёдоровой с соавт., Н.А.Сыровой с соавт. были показаны преимущества применения вариантов твердофазного иммуноферментного анализа и дот-иммуноанализа (ДИА) для контроля биосинтеза антигенов на этапах производства [1, 2]. О.С.Дураковой с соавт. проведены исследования, по результатам которых предлагается использование непрямого ДИА с золотыми наночастицами (ЗНЧ) для оценки специфической активности антигенов холерного вибриона в процессе производства [3], в т.ч. для определения О-АГ [4]. Актуальной является разработка способа оценки содержания О-АГ Инаба и О-АГ Огава в готовой лекарственной форме методом прямого ДИА ЗНЧ.

Основой представленных иммунохимических методов являются специфические гипериммунные сыворотки животных. Согласно источникам литературы, для получения сывороток предпочтительнее использовать кроликов, поскольку антиген-связывающие центры в их сывороточных антителах соответствуют группировкам из 2–6 простых сахаров в молекуле О-АГ. Вероятность встречаемости именно таких сочетаний в О-антигенах других бактерий невелика, иммунные сыворотки кроликов содержат меньшее количество гетерогенных антител и дают соответственно меньше перекрестных реакций [5].

Использование в качестве иммуногена очищенных антигенов вместо цельноклеточного корпускулярного позволяет повысить специфичность сывороток, а применение адъювантов – их активность. Опубликованы работы, в которых ЗНЧ были использованы для получения антител к целому ряду гаптенных и полноценных антигенов [6, 7]. Л.А.Дыкманом с соавт. были синтезированы конъюгаты ЗНЧ с антигенами *Vibrio cholerae*, которые были использованы для иммунизации кроликов с целью получения гипериммунных сывороток [8].

В настоящее время набирают популярность адъюванты на основе углеводов. В литературных источниках отмечаются их исключительные свойства, такие как низкая токсичность, биосовместимость, способность к биологическому разложению, низкая стоимость [9, 10]. В последнее время активно используются адъюванты на основе хитозана (Cs) и глюкановых частиц (GPs) [11–14]. Известно, что хитозан усиливает как гуморальные, так и клеточно-опосредованные иммунные реакции при вакцинации. При сравнении с традиционными адъювантами доказано, что его действие эквивалентно неполному адъюванту Фрейнда (НАФ) и превосходит гидроксид алюминия. Глюкановые частицы представляют собой очищенные клеточные стенки *Saccharomyces cerevisiae* и могут применяться в качестве системы доставки антигенов [12, 13].

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель – разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* классического биовара сероваров Инаба и Огава.

Материалы и методы

В качестве антигенных препаратов использовали О-АГ Инаба и О-АГ Огава –компоненты холерной химической вакцины. Получение препаратов О-АГ проводили в соответствии с нормативно-технической документацией на производство «Вакцины холерной бивалентной химической, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», в качестве штаммов-продуцентов использовали производственные штаммы *V. cholerae* О1 классического биовара 569В серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 серовара Огава, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Для иммунизации использовали лиофилизированные препараты О-АГ Инаба и О-АГ Огава в концентрации (по весу), соответствующей схеме иммунизации, разводящая жидкость – 0,9%-й раствор натрия хлорида.

Для получения иммунных сывороток использовали кроликов породы шиншилла, весом $2,7 \pm 0,3$ кг. Животные содержались в виварии на стандартных условиях питания. Тотальное кровопускание иммунных животных проводили после эвтаназии инъекционными препаратами, обладающими анальгезирующим и миорелаксационным действием. Все работы проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным комиссией по биоэтике ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

В качестве адъювантов использовали глюкановые и хитозановые частицы, НАФ.

Получение глюкановых частиц

GPs были получены из клеток пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) с помощью серии стадий щелочной и кислотной экстракции [15]. В течение 4 ч выращивали *S. cerevisiae* в среде на основе физиологического раствора и 6%-го раствора сахарозы при 28°C. Затем отделяли биомассу центрифугированием в течение 20 мин при 3000 об./мин, однократно промывали осадок дистиллированной водой, суспендировали в 1 М NaOH и нагревали при 90°C в течение 1 ч. Затем центрифугирование и экстракцию горячей щелочью повторяли.

Экстрагированные щелочью частицы центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об./мин, суспендировали в дистиллированной воде (рН = 4,5) и нагревали при 75°C в течение 1 ч с последующей последовательной промывкой частиц дистиллированной водой (3 раза), изопропанолом (4 раза) и ацетоном (2 раза). GPs высушивали на воздухе и хранили при 4°C.

Конъюгат GPs с О-антигеном

Для получения конъюгата к 10 мг GPs добавляли 100 мкл раствора О-АГ в концентрации, равной двукратной иммунизирующей дозе, оставляли набухать при 4°C в течение 1 ч. Затем замораживали при -20°C и лиофилизировали, после чего трехкратно отмывали стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида. Суспендировали в 1 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида и использовали для иммунизации. Эффективность связывания О-АГ с GPs оценивали измерением концентрации углеводов фенол-сернокислотным методом [16].

Получение хитозановых частиц

Для приготовления Cs использовали 0,25%-й раствор хитозана с молекулярной массой 200 кДа (степень деацетилирования 75–95%), приготовленный в 2%-м растворе уксусной кислоты, содержащем 1% твин-80. Затем 3,5 мл 10%-го раствора сульфата натрия добавляли к 200 мл раствора хитозана со скоростью 1 мл/мин при умеренном перемешивании (<50 об./мин) на магнитной мешалке в течение 60 мин при комнатной температуре [9]. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об./мин. Осадок дважды промывали в деионизированной воде. Затем проводили стерилизацию в 70%-м этиловом спирте 30 мин, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в стерильном 0,9%-м растворе натрия хлорида. Полученный раствор хитозановых частиц хранили при 4°C.

Конъюгат Cs с О-антигеном

Конъюгат получали методом адсорбции антигена на растворимой форме подготовленных частиц хитозана. Раствор Cs (OD 220 нм = 1,0) соединяли с раствором О-АГ в двукратной иммунизирующей дозе в пропорции 1:1 по объему. Инкубировали 45 ± 15 мин с постоянным перемешиванием.

Эффективность связывания О-АГ с частицами хитозана определяли измерением концентрации углеводов фенол-сернокислотным методом [16] в супернатанте после центрифугирования раствора при 5000 об./мин в течение 20 мин. Полученный конъюгат Cs с О-АГ использовали для иммунизации, если степень связывания составляла не менее 85%.

Иммунизирующие препараты с НАФ готовили *ex tempore* путем смешивания в объемном соотношении 1:1 адьюванта и раствора О-АГ.

Активность экспериментальных гипериммунных сывороток оценивали в реакции диффузионной преципитации (РДП) и методом непрямого ДИА ЗНЧ [3].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по стандартной методике определения грубых ошибок, рассчитывая среднее арифметическое значение (M), среднее квадратичное отклонение (sx) и стандартную ошибку среднего (mM) с помощью программы Microsoft Office Excel. При оценке достоверного коэффициента исходили в каждом случае из степени числа свобод выбранной нами точности 95%.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы нами было оценено токсическое действие хитозановых и глюкановых частиц, используемых в качестве адьювантов, по показателю «аномальная токсичность» (ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0004.15). Растворы Cs и GPs вводили беспородным белым мышам (19 ± 1 г) внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. На каждый адьювант приходилась группа из 5 животных. В период наблюдения (в течение 7 суток) не отмечалось изменения общего состояния по их двигательной активности, потреблению корма и воды, состоянию шерсти и слизистых оболочек, массе тела.

В ходе исследования применяли 5 схем иммунизации для О-АГ Инаба и О-АГ Огава. В качестве контрольной была выбрана подкожная двухцикловая иммунизация с НАФ. Первые 3 иммунизации проводились с недельными интервалами возрастающими дозами (100, 200 и 400 мкг) О-АГ, затем две дозы (по 500 мкг) с интервалом 3 нед. [17].

Экспериментальные схемы иммунизации. Схемы 1 и 2 состояли из 2 циклов по 3 внутривенные инъекции, с интервалами между введением антигена 4 суток в возрастающих дозах (0,5; 1; 2 мг и 1; 2; 4 мг соответственно). Второй цикл начинали после 14-дневного перерыва (1; 2; 4 мг и 2; 4; 8 мг для схемы 1 и 2).

Схемы 3 и 4 состояли из 2 циклов иммунизации по 3 инъекции в дозах 2; 4; 4 мг: 1-й цикл – способ введения антигена подкожный с использованием GPs или Cs в качестве адьюванта, 2-й цикл – внутривенное введение иммуногена без применения адьюванта. Интервал между циклами составлял 30 суток.

Через 7 суток после последней инъекции каждого цикла проводили пробное кровопускание с целью определения уровня иммунного ответа животного-продуцента. Оценивали специфическую активность сывороток в реакции диффузионной преципитации с гомологичными антигенами. В случае, если после 2-го цикла иммунизации активность сывороток была низкой, дополнительно внутривенно вводили 2–8 мг антигена. Тотальное кровопускание проводили на 8–10-е сутки после последней инъекции.

Нами были получены по 5 сывороток к каждому О-АГ и определена их активность и специфичность в РДП и ДИА ЗНЧ. В качестве контрольной схемы сравнения использовали протокол иммунизации, представленный в литературе [16], следуя которому была получена кроличья сыворотка к липополисахариду *V. cholerae* O1 серогруппы.

Нами установлена активность всех полученных гипериммунных сывороток, однако регистрировалось наличие перекрестных реакций с гетерологичным О-АГ. Показатели активности в ДИА ЗНЧ представлены на рис. 1, 2.

Применение разработанных схем иммунизации кроликов позволяет получить специфические поликлональные кроличьи сыворотки к О-АГ холерного вибриона. Нами были отобраны сыворотки с наибольшей активностью и специфичностью. Иммунизация О-АГ Инаба по схеме №4 позволила получить сыворотку со следующими параметрами (в ДИА ЗНЧ): активность с гомологичным О-АГ –1/1600, активность с гетерологичным О-АГ –1/80. Необходимо отметить, что применение частиц хитозана в качестве адьюванта при подкожном введении вызывали образование небольших грану-

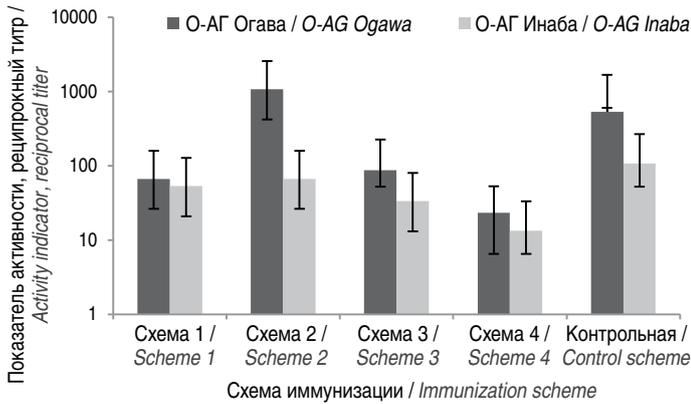


Рис. 1. Измерение активности кроличьих сывороток, полученных к О-АГ *Vibrio cholerae* серовара Огава, методом ДИА ЗНЧ ($n = 3$).
 Fig. 1. Measurement of the activity of rabbit sera obtained for O-AG *Vibrio cholerae* by serovar Ogawa, by the method of dot-immunoassay with gold nanoparticles ($n = 3$).

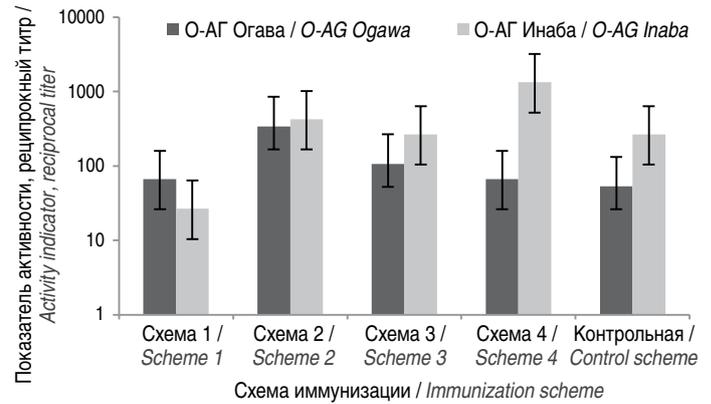


Рис. 2. Измерение активности кроличьих сывороток, полученных к О-АГ *Vibrio cholerae* серовара Инаба, методом ДИА ЗНЧ ($n = 3$).
 Fig. 2. Measurement of the activity of rabbit sera obtained for O-AG *Vibrio cholerae* serovar Inaba, by the method of dot-immunoassay with gold nanoparticles ($n = 3$).

№ образца No. sample	Сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации / Diagnostic cholera serum O1 adsorbed dry for agglutination reaction (RA)	Экспериментальная сыворотка кроличья к О-АГ Огава / Experimental rabbit serum to O-AG Ogawa	Экспериментальная сыворотка кроличья к О-АГ Инаба / Experimental rabbit serum to O-AG Inaba
1	4096	256	1024
2	4096	128	512
3	4096	128	1024
4	4096	256	2048
5	4096	128	512
6	4096	256	512
7	2048	128	256

лем, которые не оказывали сильного влияния на общее состояние животных.

Сыворотка к О-АГ Огава, полученная в соответствии со схемой №2, обладала следующими характеристиками: активность с гомологичным О-АГ –1/1280, активность с гетерологичным О-АГ –1/40.

Полученные поликлональные сыворотки были апробированы для определения О-АГ в 7 сериях готового препарата вакцины. Установлено рабочее разведение 1/10 для сыворотки к О-АГ Инаба и 1/50 для сыворотки к О-АГ Огава, которое позволяет достоверно определять содержание О-АГ Инаба и О-АГ Огава (таблица). Таким образом, нами были отобраны схемы иммунизации, позволяющие получать наиболее активные и специфичные поликлональные сыворотки, которые будут использованы для разработки способа оценки содержания О-АГ Инаба и О-АГ Огава на этапах производства вакцины холерной бивалентной химической.

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 interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Федорова ВА, Терешкина НЕ, Громова ОВ, Сырова НА, Девдариани ЗЛ, Ермаков НМ, и др. Новые методы контроля синтеза иммуногенов при производстве химической вакцины против холеры, вызванной *V. cholerae* O139. Биотехнология. 1999;2:82-88.
2. Сырова НА. Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам *Vibrio cholerae* O1 Инаба и Огава. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 2005.
3. Дуракова ОС, Громова ОВ, Киреев МН, Воробьева СА, Клокова ОД, Ливанова ЛФ, и др. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(4):10-13.
4. Воробьева СА, Дуракова ОС, Волох ОА, Громова ОВ. Возможность определения специфической активности О-АГ в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2018;18(3):318-319. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319
5. Михайлова ВА. Разработка технологии получения кроличьей холерной агглютинирующей О-сыворотки. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Иркутск, 1998.
6. Киреев МН, Полунина ТА, Гусева НП, Подборонова НА, Краснов ЯМ, Тараненко ТМ. Изучение иммуногенных свойств антигена Ф1 чумного микроба, конъюгированного с наночастицами коллоидного золота и серебра. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;2(96):43-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-2(96)-43-45
7. Староверов СА, Фомин АС, Габалов КП, Иващенко СВ, Маниесон ВЭ, Дыкман ЛА. Иммуностимулирующее действие наночастиц золота, конъюгиро-

- ванных с антигеном *Yersinia enterocolitica*. Инфекция и иммунитет. 2021;11(2):377-382. DOI: 10.15789/2220-7619-IEO-1405
8. Дыкман ЛА, Волох ОА, Громова ОВ, Дуракова ОС, Воробьева СА, Киреев МН, и др. Получение и характеристика антител к протективным антигенам холерного вибриона, конъюгированным с наночастицами золота. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020;490(1):27-30. DOI: 10.31857/S2686738920010084
9. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. Mar Drugs. 2016 May 17;14(5):99. DOI: 10.3390/md14050099
10. Paul P, Kolesinska B, Sujka W. Chitosan and Its Derivatives – Biomaterials with Diverse Biological Activity for Manifold Applications. Mini Rev Med Chem. 2019;19(9):737-750. DOI: 10.2174/1389557519666190112142735
11. Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, et al. Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. Clin Dev Immunol. 2013;2013:387023. DOI: 10.1155/2013/387023
12. Soares E, Jesus S, Borges O. Chitosan: β -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. Eur J Pharm Biopharm. 2018 Oct;131:33-43. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.07.018
13. Whelan AO, Flick-Smith HC, Homan J, Shen ZT, Carpenter Z, Khoshkenar P, et al. Protection induced by a *Francisella tularensis* subunit vaccine delivered by glucan particles. PLoS One. 2018 Oct 8;13(10):e0200213. DOI: 10.1371/journal.pone.0200213
14. Курашова СС, Дзагурова ТК, Ишмухаметов АА, Егорова МС, Баловнева МВ, Соцкова СЕ, и др. Адьюванты на основе углеводов для производства вакцин. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(2):81-91. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91
15. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal β -glucans and toll-like receptor agonists. Infect Immun. 2009 May;77(5):1774-81. DOI: 10.1128/IAI.00086-09
16. Dubois M, Gilles KA, Hamilton J, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956;28:350-356.
17. Mukhopadhyay S, Nandi B, Ghose AC. Antibodies (IgG) to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 mediate protection through inhibition of intestinal adherence and colonisation in a mouse model. FEMS Microbiol Lett. 2000 Apr 1;185(1):29-35. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09036.x
6. Kireev MN, Polunina TA, Guseva NP, Podboronova NA, Krasnov YaM, Taranenko TM. To study the immunogenic properties of the plague microbe F1 antigen conjugated with colloidal gold and silver nanoparticles. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;2(96):43-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-2(96)-43-45 (In Russian).
7. Staroverov SA, Fomin AS, Gabalov KP, Ivashchenko SV, Manieson VE, Dykman LA. Immunostimulating effect of gold nanoparticles conjugated with *Yersinia enterocolitica* antigen. Infection and immunity. 2021;11(2):377-382. DOI: 10.15789/2220-7619-IEO-1405 (In Russian).
8. Dykman LA, Volokh OA, Gromova OV, Durakova OS, Vorobyova SA, Kireev MN, et al. Preparation and characterization of antibodies to protective vibrio cholera antigens conjugated with gold nanoparticles. Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences. 2020;490(1):27-30. DOI: 10.31857/S2686738920010084 (In Russian).
9. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. Mar Drugs. 2016 May 17;14(5):99. DOI: 10.3390/md14050099
10. Paul P, Kolesinska B, Sujka W. Chitosan and Its Derivatives – Biomaterials with Diverse Biological Activity for Manifold Applications. Mini Rev Med Chem. 2019;19(9):737-750. DOI: 10.2174/1389557519666190112142735
11. Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, et al. Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. Clin Dev Immunol. 2013;2013:387023. DOI: 10.1155/2013/387023
12. Soares E, Jesus S, Borges O. Chitosan: β -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. Eur J Pharm Biopharm. 2018 Oct;131:33-43. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.07.018
13. Whelan AO, Flick-Smith HC, Homan J, Shen ZT, Carpenter Z, Khoshkenar P, et al. Protection induced by a *Francisella tularensis* subunit vaccine delivered by glucan particles. PLoS One. 2018 Oct 8;13(10):e0200213. DOI: 10.1371/journal.pone.0200213
14. Kurashova S, Dzagurova TK, Ishmukhametov A, Egorova MS, Balovneva MV, Sotskova SE, et al. Carbohydrate-based adjuvants for vaccine production. Biologics. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(2):81-91. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91 (In Russian).
15. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal β -glucans and toll-like receptor agonists. Infect Immun. 2009 May;77(5):1774-81. DOI: 10.1128/IAI.00086-09
16. Dubois M, Gilles KA, Hamilton J, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956;28:350-356.
17. Mukhopadhyay S, Nandi B, Ghose AC. Antibodies (IgG) to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 mediate protection through inhibition of intestinal adherence and colonisation in a mouse model. FEMS Microbiol Lett. 2000 Apr 1;185(1):29-35. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09036.x

References

1. Fedorova VA, Tereshkina NE, Gromova OV, Syrova NA, Devdariani ZL, Ermakov NM, et al. New methods of control of immunogen synthesis in the production of chemical vaccine against cholera caused by *V. cholerae* O139. Biotechnology. 1999;2:82-88. (In Russian).
2. Syrova NA. Preparation, characterization and biotechnological aspects of the application of poly- and monoclonal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 Inaba and Ogawa antigens. Abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences. Saratov, 2005. (In Russian).
3. Durakova OS, Gromova OV, Kireev MN, Vorobeva SA, Klokova OD, Livanova LF, et al. The use of dot-immunoassay to determine the specific activity of antigens in the production of cholera vaccine. Bulletin of Biotechnology and Physico-chemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov. 2018;14(4):10-13. (In Russian).
4. Vorobeva SA, Durakova OS, Volokh OA, Gromova OV. The possibility of determining the specific activity of O-AG in the production of cholera chemical vaccine using dot analysis. News of Saratov University. A new series. Chemistry series. Biology. Ecology. 2018;18(3):318-319. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319 (In Russian).
5. Mikhailova VA. Development of technology for obtaining rabbit cholera agglutinating O-serum. Abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences, Irkutsk, 1998. (In Russian).

Информация о соавторах:

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Киреев Михаил Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga V. Gromova, MD, PhD, Senior Researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Michael N. Kireev, MD, PhD, Leading Researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Oksana A. Volokh, PhD (Biology), head of the Department of Preventive Drugs, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Выделение РНК из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Н.Ю.Буданова, Д.В.Гриненко

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

Методики выделения на основе гуанидина и формамида адаптированы для выделения суммарной РНК из клеток киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в стационарной фазе культивирования с целью аналитического обеспечения производства двуспиральной РНК, являющейся перспективным иммуномодулятором. Выход суммарной РНК при выделении с гуанидином и формамидом составил 10,2 и 6,0 мкг/мг биомассы соответственно. Методика выделения при использовании формамида оптимальна для выделения РНК для дальнейшего количественного анализа двуспиральной РНК, поскольку требует значительно меньше времени, менее трудоемкая, экономичнее по затратам реагентов. Степень лизиса клеток дрожжей при использовании формамида составила ~20%.

Ключевые слова: выделение РНК, *Saccharomyces cerevisiae*, двуспиральная РНК, формамид, лизис клеток

Для цитирования: Буданова Н.Ю., Гриненко Д.В. Выделение РНК из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Бактериология. 2024; 9(2): 40–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-40-44

Extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*

N.Yu.Budanova, D.V.Grinenko

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

For analytical support in the production of double-stranded RNA of the killer yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*, a promising immunomodulator, methods for isolating total RNA based on guanidine and formamide has been adapted for stationary phase culture. Yield of total RNA using guanidine and formamide were 10,2 and 6,0 µg per mg of biomass. Formamide-based isolation RNA was optimal for subsequent quantitative analysis of double-stranded RNA because it was less time-consuming and labor-intensive and also was more economical in terms of reagent expenses. The degree of lysis of yeast cells using formamide was approximately 20%.

Key words: RNA isolation, *Saccharomyces cerevisiae*, double-stranded RNA, formamide, cell lysis

For citation: Budanova N.Yu., Grinenko D.V. Extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. Bacteriology. 2024; 9(2): 40–44. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-40-44

Существует необходимость в быстрых и простых методах выделения интактной РНК высокого качества для использования как в генетических исследованиях и анализах, так и в биотехнологических процессах для количественного определения целевых продуктов на основе РНК.

Дрожжи давно и интенсивно используются в биотехнологии для производства ферментированных напитков, биоэтанола, рекомбинантных белков и т.д. Ценным свойством киллерных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* является наличие в клетках двуспиральных полирибонуклеотидов (дсРНК), обладающих иммуномодулирующими свойствами [1–3]. Киллерный эффект, обусловленный наличием дсРНК,

проявляется в синтезе экзотоксинов (т.н. киллер-факторов, являющихся белками или гликопротеинами), летальных для других чувствительных штаммов дрожжей. Киллерная активность может быть направлена не только на представителей своего вида, но и против широкого спектра эукариотических и прокариотических организмов. Препараты на основе дсРНК обладают малой токсичностью, пролонгированным действием и обеспечивают достоверный противовирусный эффект.

Ранее в России из дрожжей *S. cerevisiae* производили два ветеринарных препарата на основе высокополимерной РНК, Полирибонат и Ридостин, причем Ридостин содержит высо-

Для корреспонденции:

Буданова Наталья Юрьевна, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 12.04.2024, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Natalya Yu. Budanova, PhD, researcher of biotechnology department of 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
E-mail: budanova@obolensk.org

The article was received 12.04.2024, accepted for publication 28.06.2024

комолекулярную дсРНК. В настоящее время эти препараты сняты с производства по причине плохого соотношения цена/качество. Вместо них выпускается ветеринарный препарат Виталанг-2 на основе одноцепочечной высокополимерной РНК, содержащей короткие двуспиральные участки. В отличие от Полирибоната и Ридостина, состоящих из гидрофильных молекул, хорошо растворимых в воде, Виталанг-2 содержит олеиновую кислоту, что, с одной стороны, приводит к снижению его растворимости в воде, а с другой – дает повышенную способность проникать через биологические мембраны и, как следствие, проявлять более высокую биологическую активность.

В Латвии выпускаются фармацевтический препарат Ларифан в разных лекарственных формах, содержащий дсРНК, производимый биотехнологически с помощью бактерий *Escherichia coli*, инфицированных бактериофагом.

В России в 2022 г. появился первый противовирусный препарат Радамин Виро на основе дсРНК, выделенной из киллерного штамма дрожжей *S. cerevisiae* [4]. Таким образом, известны бактериальные и киллерные дрожжевые продуценты дсРНК.

Для рекомбинантных бактерий количество целевого продукта (дсРНК) повышается при увеличении нарабатываемой биомассы [5], данные по кинетике наработки дсРНК в клетках дрожжей в литературе отсутствуют. Однако очевидно, что для оптимизации производственного процесса получения дсРНК от стадий эталонной культуры и биосинтеза (культивирования) до конечного выделения продукта необходимо наличие простого, достоверного и незатратного метода определения дсРНК как в конечной рецептуре, так и непосредственно (что более сложно) в биомассе штамма продуцента.

Определение дсРНК включает следующие этапы: выделение РНК (лизис клеток и, часто, выделение суммарной РНК) и определение целевых фрагментов дсРНК в лизате клеток или в образце суммарной РНК. Наиболее сложным этапом является лизис клеток, поскольку многие виды дрожжей, в т.ч. *S. cerevisiae*, отличаются чрезвычайно высокой устойчивостью к лизису, причем воздействие на клетки ограничено необходимостью не допустить деградации высокомолекулярной дсРНК.

Методики выделения РНК из клеток дрожжей требуют трудоемких и иногда длительных шагов. Классическим способом выделения РНК является фенол-хлороформная экстракция по Хромински [6], в ходе которой лизис осуществляется в растворе, содержащем гуанидин тиоцианат и лаурилсаркозинат, а РНК отделяется от ДНК экстракцией из кислого раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, ацетат натрия, фенол и хлороформ (в растворе для выделения присутствуют также меркаптоэтанол и цитрат натрия).

Из методов лизиса для выделения РНК можно выделить метод лизиса клеток дрожжей при 65°C в присутствии додецилсульфата натрия [7], ферментативный лизис клеток дрожжей [8], метод «горячего» фенола [9].

Методы без механической гомогенизации часто используются для выделения РНК из клеток дрожжей логарифмической фазы роста, поскольку они дают РНК воспроизводимого качества и количества. Ситуация усложняется при работе с клетками в стационарной фазе роста, в этом случае жела-

тельно использовать гомогенизацию. Возможно, наиболее подходящим методом выделения РНК из устойчивых дрожжевых клеток является растирание клеток дрожжей, замороженных в жидком азоте, с абразивом (стеклянные шарики), как описано для клеток *Candida albicans*, собранных в стационарной фазе [10]. Однако такая пробоподготовка образца для количественного определения дсРНК на практике, скорее всего, будет невозможной (а также неподходящей для одновременной обработки серии образцов).

Еще один метод лизиса, относительно новый, разработанный для выделения РНК из грамотрицательных бактерий и дрожжей, изначально с использованием механической гомогенизации и формамида, *RNAsnap*TM, может быть использован для разрушения клеток дрожжей и без механической гомогенизации [11]. Лизис клеток при использовании формамида быстрый, простой, позволяет эффективно извлекать широкий спектр РНК, для дрожжей в логарифмической фазе роста выход РНК примерно в 3 раза выше по сравнению со стандартным протоколом горячего фенола [11]. Авторы отмечают, что при извлечении РНК формаимидом и горячим фенолом имеются различия в эффективности извлечения разных РНК.

Цель данной работы состояла в исследовании и сравнении способов лизиса клеток киллерных дрожжей *S. cerevisiae*, полученных в стационарной фазе культивирования, в применении к задаче оптимизации процесса культивирования. Оценивали лизис клеток по таким параметрам, как выход суммарной РНК, трудоемкость, время анализа, возможность одновременной пробоподготовки нескольких образцов (до 10 образцов), стоимость и доступность реагентов для выделения РНК.

Материалы и методы

Штаммы. Для выделения суммарной РНК использовали дрожжи хлебопекарные прессованные «Люкс Экстра» (САФ-НЕВА, хранение при 4°C), киллерные дрожжи *S. cerevisiae* ВКПМ Y-448 из рабочей коллекции (хранение при -70°C).

Реактивы: гуанидин тиоцианат (for molecular biology grade, PanReac Applichem), натрия цитрат 2-водный (pure EP, USP, Диаэм), β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich/Merck), фенол (ультрачистый для молекулярной биологии, >99,7%, осч, diaGene, Диаэм), изоамиловый спирт (чда, Компонент-реактив), хлороформ (чда, Компонент-реактив), спирт этиловый 96% (ч, Константа-Фарм М), деионизованная вода без нуклеаз (Евроген), формаимид (для молекулярной биологии, неоFroxx), ЭДТА динатриевая соль (Диаэм), зимолиаза лиофилизованная с буфером для хранения, 2000 Ед (Zymo Research), набор RNeasy Mini Kit для выделения РНК из клеток и тканей, из дрожжей, 50 реакций. Для проведения гель-электрофореза использовали маркеры размеров ДНК Sky-High (13 фрагментов от 250 до 10 000 п.н., 0,1 мг/мл (Хеликон), 6×Orange DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific).

Суммарное содержание РНК оценивали спектрофотометрически по поглощению ($I = 260$ нм) при использовании спектрофотометра UNICO-2804 (United Products & Instruments, США). Для проведения гель-электрофореза использовали источник питания Electrophoresis Power Supply-EP5 601 (Amersham Pharmacia Biotech, США), камеру для горизон-

тального электрофореза SE-2, укомплектованную рамкой для геля, заливочным столиком с уровнем и гребенкой на 25 зубцов для образования лунок в геле (Хеликон, Россия), High Performance UltraViolet Transilluminator TFM-30 (UVP, США). В образцы вносили по 1 мкл красителя 6×Orange DNA Loading Dye.

Методика выделения при использовании формамида

При работе с навесками клеток дрожжей учитывали рекомендуемый объем лизирующего раствора ФАЭ для суспензии клеток определенной оптической плотности и объема аликвоты [11], необходимо минимум 5 мкл ФАЭ/1 мг дрожжей. В работе варьировали соотношение массы навески дрожжей / объема лизирующего раствора для получения максимального выхода суммарной РНК.

Для выделения суммарной РНК с формамидом готовили раствор ФАЭ: 98% формамида, 2% 0,5 М ЭДТА, pH = 8,03.

Отбирали навеску клеток дрожжей в интервале 1–14 мг в стерильные без нуклеаз пробирки типа эппендорф на 1,5 мл, добавляли 100 мкл раствора ФАЭ, ресуспендировали пипетированием. Суспензию клеток в ФАЭ нагревали в течение 10 мин при 70°C в твердотельном термостате Thermomixer comfort и центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при скорости 14 000 об./мин. Отбирали супернатант, избегая отбора клеток. Для определения суммарного содержания РНК дополнительно очищали образцы, добавляя 800 мкл воды, 500 мкл фенола (pH 4,56) и 200 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1 по V).

Методика выделения при использовании зимолиазы

В эппендорфы отбирали аликвоту суспензии клеток дрожжей, содержащую $(1-2) \cdot 10^7$ клеток, центрифугировали в течение 5 мин при +4°C при скорости 4000 об./мин. Удаляли супернатант и начинали работу с клетками по методике Qiagen RNeasy minikit [12].

Методика выделения при использовании гуанидина тиоцианата

Использовали концентрат клеток, полученных в стационарной фазе и замороженных после ферментации (хранение при -70°C).

Использовали классическую методику выделения суммарной РНК на основе гуанидина тиоцианата, модифицировали ее введением нагревания клеток в лизирующем растворе при +70°C в течение 40 мин. Для выделения РНК с механическим разрушением клеток готовили суспензию, содержащую 329 мг клеток и 42,5 мл лизирующего буфера с гуанидином; к 41,5 мл суспензии добавили 2,96 г стерильного кварцевого песка. Встряхивали на гомогенизаторе IKA Ultra Turrax tube drive 70 мин на скорости 4000 об./мин, затем отбирали 500 мкл суспензии, нагревали 40 мин при +70°C. Далее добавляли подкисленный фенол и продолжали методику аналогично без использования кварцевого песка.

Разрушение клеток дрожжей при использовании ультразвукового гомогенизатора

В пробирку на 50 мл вносили навеску 202 мг клеток дрожжей и 7,5 мл лизирующего буфера ФАЭ. Соотношение количества клеток и лизирующего буфера соответствовало

условиям лизиса без использования ультразвука. Использовали ультразвуковой гомогенизатор Bandelin Sonopuls HD 3400, зонд VS 200 T (Bandelin, Германия), подбирая условия разрушения 100% клеток. Разрушение клеток контролировали при помощи микроскопа OLYMPUS BX41. Определили условия разрушения 100% клеток: импульсный режим ультразвука (15 с ультразвук / 15 с пауза), общее время обработки 30 мин, 80% мощности, затем образец помещали в горячую воду (~90°C) на 20 мин. Цикл ультразвук/горячая вода для 100%-го разрушения клеток повторяли 3 раза. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали (Eppendorf 5920R), центрифугат хранили при -18°C для дальнейшей работы.

Необходимо заметить, что ультразвук используемой мощности вызвал деградацию РНК, что выразилось в отсутствии высокомолекулярных РНК при анализе образцов методом гель-электрофореза. В данной работе ультразвук использовали только для спектрофотометрического определения суммарных фрагментов РНК, чтобы затем оценить степень лизиса клеток. Очевидно, что разрушение клеток ультразвуком не может быть использовано для количественного анализа целевых дсРНК.

Оценка степени лизиса клеток

Степень лизиса клеток оценивали по соотношению выделенного количества суммарной РНК по конкретной методике к количеству суммарной РНК при 100%-м разрушении клеток. Например, при 100%-м разрушении клеток с использованием ультразвука выход суммарной РНК составил 29,6 мкг/мг дрожжей. Выход суммарной РНК при использовании формамида (без ультразвука) – 5,8 мкг/мг дрожжей. Таким образом, методика выделения суммарной РНК с формамидом позволила лизировать ~20% клеток.

Результаты исследования и их обсуждение

В работе использовали штамм киллерных дрожжей ВКПМ Y-448 с наличием дсРНК и дрожжи хлебопекарные прессованные «Люкс Экстра», содержащие, по данным [13], также L-форму дсРНК. Выделение суммарной РНК из клеток дрожжей проводили при использовании следующих методик: на основе гуанидина и экстракции фенол/хлороформ, ферментативного лизиса при использовании набора Qiagen RNeasy minikit и по методике лизиса с формамидом. Оценивали результаты выделения по выходу суммарной РНК, чистоте препарата и наличию полос дсРНК в геле. Все методики оценивали также по показателям трудоемкости, времени выполнения, доступности реагентов, возможности масштабирования по количеству образцов. Результаты представлены в таблице. Во всех методиках использовали штамм Y-448, методику выделения с формамидом обрабатывали также на образце дрожжей «Люкс Экстра».

Максимальный выход суммарной РНК получили при использовании химического лизиса клеток гуанидином, выход составил 10,2 мкг/мг клеток дрожжей, чистоту выделенной РНК оценивали по соотношению оптической плотности на длинах волн 260 и 280 нм, A260/A280, значения соотношения были в интервале 2,0–2,1, что соответствовало чистому образцу суммарной РНК. Уменьшение выхода РНК при исполь-

Таблица. Сравнение методов лизиса клеток дрожжей
Table. Comparison of yeast cell lysis methods

	Ферментативный / <i>Enzymatic</i>	Химические / <i>Chemical</i>	Химический с механическим разрушением клеток ¹ / <i>Chemical with mechanical destruction of cells¹</i>	
	на основе зимолиазы ² / <i>based on zymolyase²</i>	гуанидин + фенол/хлороформ / <i>guanidine + phenol/chloroform</i>	ФАЭ ³	гуанидин + фенол/ хлороформ / <i>guanidine + phenol/chloroform</i>
Выход суммарной РНК, мкг/мг биомассы дрожжей ^{4,5} / <i>Yield of total RNA, µg/mg yeast biomass^{4,5}</i>	4,8	10,2	6,0/5,8	7,6
Вероятность деградации дсРНК в процессе выделения ⁶ / <i>Probability of RNA degradation during isolation⁶</i>	Низкая / <i>Low</i>	Низкая / <i>Low</i>	Низкая / <i>Low</i>	Средняя / <i>Medium</i>
Трудоемкость / <i>Labor intensity</i>	Низкая / <i>Low</i>	Средняя / <i>Medium</i>	Низкая / <i>Low</i>	Высокая / <i>High</i>
Время пробоподготовки 1 образца, мин / <i>Sample preparation time for 1 sample, min</i>	20–25	160	20	180–200
Возможность одновременной пробоподготовки нескольких образцов (до 10 образцов) / <i>Possibility of simultaneous sample preparation of several samples (up to 10 samples)</i>	+	+	+	-
Доступность реагентов для выделения РНК / <i>Availability of reagents for RNA isolation</i>	Низкая / <i>Low</i>	Средняя / <i>Medium</i>	Высокая /	Средняя / <i>Medium</i>

¹ при использовании кварцевого песка и гомогенизатора IKA Ultra Turrax tube drive; / ¹ using silica sand and IKA Ultra Turrax tube drive homogenizer;
² методика выделения Qiagen; / ² Qiagen isolation technique;
³ при использовании штамма ВКПМ Y-448/хлебопекарных дрожжей; / ³ using VKPM strain Y-448/baker's yeast;
⁴ определяли спектрофотометрически; / ⁴ determined spectrophotometrically;
⁵ среднее, из 3 образцов, коэффициент вариации не превышает 20%; / ⁵ average, from 3 samples, the coefficient of variation does not exceed 20%;
⁶ при соблюдении правил работы с нуклеиновыми кислотами. / ⁶ if the rules of working with nucleic acids are observed.

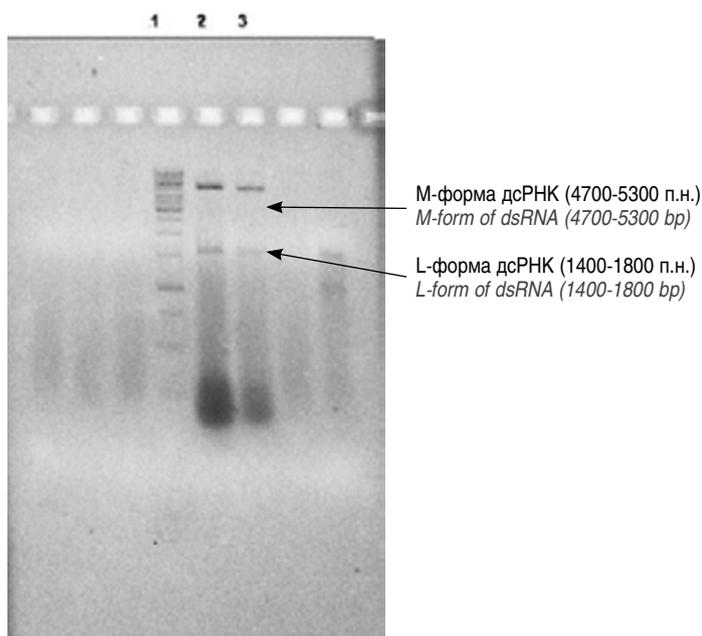


Рисунок. Гель-электрофорез выделенных образцов РНК: подтверждение наличия дсРНК в образцах штамма ВКПМ Y-448 (выделение с гуанидином). Краситель 6×Orange DNA Loading Dye. Дорожка 1: маркер размеров ДНК (13 фрагментов от 250 до 10 000 п.н.). На дорожках образцов 2, 3, полученных в стационарной фазе культивирования, обозначены две полосы, соответствующие молекулярным массам 1600 п.н. и 5000 п.н. (М- и L-формы дсРНК).

Figure. Gel electrophoresis of isolated RNA samples: confirmation of the presence of dsRNA in samples of VKPM strain Y-448 (isolation with guanidine). 6×Orange DNA Loading Dye. Lane 1: DNA size marker (13 fragments from 250 to 10,000 bp). Two bands corresponding to molecular masses of 1600 bp and 5000 bp (M- and L-forms of dsRNA) are marked on the lanes of samples 2, 3 obtained in the stationary phase of cultivation.

зовании механического разрушения клеток (кварцевый песок и гомогенизатор) связано с сорбцией нуклеиновых кислот на поверхности песка (силикагеля) и неполной десорбцией с поверхности в используемых условиях.

И химический, и ферментативный лизис клеток позволил получить дсРНК из клеток, собранных из логарифмической и стационарной фазы культивирования. Наличие в лизате М-формы (1400–1800 п.н.) и L-формы (4700–5300 п.н.) дсРНК подтверждали методом гель-электрофореза (рисунок). L-форма отвечает за образование белковых капсул, в которых находятся отдельно М- и L-формы дсРНК, М-форма – за синтез токсина и устойчивость к нему.

С учетом всех требований к способу лизиса клеток в приложении к задаче оптимизации производственного процесса получения дсРНК для выделения РНК с целью дальнейшего количественного анализа дсРНК оптимален способ лизиса на основе формамида. Методика выделения суммарной РНК с формамидом позволила лизировать ~20% клеток. Оценка степени лизиса необходима в дальнейшей работе для количественного определения дсРНК, нарабатанной во время ферментации.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Danilenko ED, Belkina AO, Sysoeva GM. Development of Drugs Based on High-Polymeric Double-Stranded RNA for Antiviral and Antitumor Therapy. *Biochem Mosc Suppl B Biomed Chem.* 2019;13(4):308-323. DOI: 10.1134/S1990750819040036
2. García K, Ramírez-Araya S, Díaz Á, Reyes-Cerpa S, Espejo RT, Higuera G, et al. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. *Front Microbiol.* 2015 Apr 16;6:300. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00300
3. Эршов ФИ, Наровлянский АН. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. *Вопросы вирусологии* 2015;60(2):5-10.
4. Радаева ОА, Таганов АВ, Рогожина ЕА. Перспективы использования индукторов интерферона на основе дуплексной РНК для лечения вирусных и бактериальных инфекций. *ПМЖ. Медицинское обозрение.* 2022;6(11):643-649. DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-11-643-649
5. Papic L, Rivas J, Toledo S, Romero J. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnol. Rep.* 2018;20:e00292. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00292
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
7. Li J, Liu J, Wang X, Zhao L, Chen Q, Zhao W. A waterbath method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* 2009;384(1):189-190. DOI: 10.1016/j.ab.2008.09.021
8. Achilles J, Stahl F, Harms H, Müller S. Isolation of intact RNA from cytometrically sorted *Saccharomyces cerevisiae* for the analysis of intrapopulation diversity of gene expression. *Nat Protoc* 2007;2(9):2203-11. DOI: 10.1038/nprot.2007.322
9. Mannan MA, Sharma S, Ganesan K. Total RNA isolation from recalcitrant yeast cells. *Anal Biochem.* 2009;389(1):77-9. DOI: 10.1016/j.ab.2009.03.014
10. Uppuluri P, Perumal P, Chaffin WL. Analysis of RNA species of various sizes from stationary phase planktonic yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(1):110-7. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00143.x
11. Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.* 2017 Dec 2;14(12):1722-1726. DOI: 10.1080/15476286.2017.1345417
12. RNeasy Kits. RNA Extraction Kits. QIAGEN [Electronic resource]. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits> (accessed 03.06.2024).
13. Шевченко ЗА, Телегина ЮВ, Лебедев ЛР. Способ получения препаратов на основе РНК. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.* 2017;8:9-13.
- Mosc Suppl B Biomed Chem. 2019;13(4):308-323. DOI: 10.1134/S1990750819040036
2. García K, Ramírez-Araya S, Díaz Á, Reyes-Cerpa S, Espejo RT, Higuera G, et al. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. *Front Microbiol.* 2015 Apr 16;6:300. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00300
3. Ershov FI, Narovlyansky AN. Usage of interferon inducers during viral infections. *Problems of Virology.* 2015;60(2):5-10. (In Russian).
4. Radaeva OA, Taganov AV, Rogozhina EA. Prospects of using interferon inducers of the double stranded RNA type for the treatment of viral and bacterial infections. *Russian Medical Inquiry.* 2022;6(11):643-649. DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-11-643-649 (In Russian).
5. Papic L, Rivas J, Toledo S, Romero J. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnol. Rep.* 2018;20:e00292. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00292
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
7. Li J, Liu J, Wang X, Zhao L, Chen Q, Zhao W. A waterbath method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* 2009;384(1):189-190. DOI: 10.1016/j.ab.2008.09.021
8. Achilles J, Stahl F, Harms H, Müller S. Isolation of intact RNA from cytometrically sorted *Saccharomyces cerevisiae* for the analysis of intrapopulation diversity of gene expression. *Nat Protoc* 2007;2(9):2203-11. DOI: 10.1038/nprot.2007.322
9. Mannan MA, Sharma S, Ganesan K. Total RNA isolation from recalcitrant yeast cells. *Anal Biochem.* 2009;389(1):77-9. DOI: 10.1016/j.ab.2009.03.014
10. Uppuluri P, Perumal P, Chaffin WL. Analysis of RNA species of various sizes from stationary phase planktonic yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(1):110-7. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00143.x
11. Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.* 2017 Dec 2;14(12):1722-1726. DOI: 10.1080/15476286.2017.1345417
12. RNeasy Kits. RNA Extraction Kits. QIAGEN [Electronic resource]. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits> (accessed 03.06.2024).
13. Shevchenko ZA, Teligina YuV, Lebedev LR. A method for obtaining RNA-based preparations. *Current problems of the humanities and natural sciences.* 2017;8:9-13. (In Russian).

References

1. Danilenko ED, Belkina AO, Sysoeva GM. Development of Drugs Based on High-Polymeric Double-Stranded RNA for Antiviral and Antitumor Therapy. *Biochem*

Информация о соавторе:

Гриненко Дмитрий Владимирович, инженер II категории отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-author:

Dmitry V. Grinenko, Engineer Category II of the Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Изучение возможности индукции бактериофагов у природных и ЛПС-дефектных штаммов возбудителя туляремии и близкородственных франциселл

М.В.Цимбалистова, М.П.Погожова, А.В.Тюрина, М.Г.Мелоян, Н.В.Павлович

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

Туляремия – острое инфекционное заболевание человека и животных, природные очаги которого широко распространены в Северном полушарии, в т.ч. на территории России. Возбудитель туляремии (*Francisella tularensis*) включает четыре подвида, отличающиеся по ареалу циркуляции, биохимическим свойствам и патогенности для человека и животных. Клиническое значение в инфекционной патологии человека имеют только три основных подвида (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *mediasiatica* и *holarctica*), тогда как близкородственные франциселлы (*F. tularensis* subsp. *novicida* и *F. philomiragia*) вызывают туляремиеподобное заболевание у иммунокомпрометированных людей. Важным является своевременное выявление лиц с подозрением на туляремию и назначение эффективной терапии. В последние годы отмечается повышенный интерес исследователей к бактериофагам, которые могут быть использованы в профилактике, лечении и диагностике инфекции. В литературе имеются лишь единичные сообщения о выделении туляремийного бактериофага, однако на сегодняшний день у экспериментаторов отсутствуют воспроизводимые методы индукции бактериофага *F. tularensis*. Весьма слабо изучен вопрос о феномене лизогении у франциселл. Целью настоящего исследования явилось изучение возможности выделения бактериофагов из природных вирулентных штаммов *F. tularensis* трех основных подвигов, а также из их изогенных авирулентных ЛПС-дефектных вариантов и близкородственных франциселл. При сравнительном анализе эффективности различных факторов для индукции бактериофага установлено, что вне зависимости от методических приемов и использованных штаммов *F. tularensis*, все наши попытки изолировать бактериофаг не увенчались успехом. В то же время с помощью хлороформа получены бактериофаги из *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112 и D9876) и *F. philomiragia* (F9693), активные в отношении гомологичных и гетерологичных штаммов франциселл, а также *Escherichia coli* φ и *E. coli* K12. Полученные препараты не оказывали литического действия на вирулентные и авирулентные культуры *F. tularensis*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, франциселлы, бактериофаг

Для цитирования: Цимбалистова М.В., Погожова М.П., Тюрина А.В., Мелоян М.Г., Павлович Н.В. Изучение возможности индукции бактериофагов у природных и ЛПС-дефектных штаммов возбудителя туляремии и близкородственных франциселл. Бактериология. 2024; 9(2): 45–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-45-49

Studying the possibility of bacteriophage induction in natural and LPS-defective strains of tularemia and closely related francisella

M.V.Tsimbalistova, M.P.Pogozhova, A.V.Tyurina, M.G.Meloyan, N.V.Pavlovich

Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Tularemia is an acute infectious disease of humans and animals, the natural foci of which are widespread in the Northern hemisphere, including the territory of the Russian Federation. The causative agent of tularemia (*Francisella tularensis*) includes four subspecies that differ in their circulation area, biochemical properties and pathogenicity for humans and animals. Only three main subspecies have clinical significance in human infectious pathology (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *mediasiatica* and *holarctica*), whereas closely related *Francisellas* (*F. tularensis* subsp. *novicida* and *F. philomiragia*) cause tularemia-like disease in immunocompromised people. It is important to timely identify individuals with suspected tularemia and prescribe effective therapy. In recent years, there has been an increased interest among researchers in bacteriophages, which can be used in the prevention, treatment and diagnosis of infection. In the literature, there are limited reports on the isolation of tularemia bacteriophage, however, the researchers do not yet have reproducible methods for inducing the *F. tularensis* bacteriophage. The lysogeny phenomenon in *Francisella* is underinvestigated now. The purpose of this study was to study the possibility of isolating bacteriophages from natural virulent strains of *F. tularensis* of three main subspecies, as well as from their isogenic

Для корреспонденции:

Цимбалистова Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

E-mail: info@tularemia.ru

Статья поступила 09.01.2024, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Marina V. Tsimbalistova, PhD, MD, Senior Researcher at the Laboratory Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

E-mail: info@tularemia.ru

The article was received 09.01.2024, accepted for publication 28.06.2024

avirulent LPS-defective variants and closely related *Francisella*. A comparative analysis of the effectiveness of various factors for bacteriophage induction showed that, regardless of the methodological techniques and the *F. tularensis* strains used, all our attempts to isolate the bacteriophage were unsuccessful. At the same time, using chloroform were obtained bacteriophages from *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112 and D9876) and *F. philomiragia* (F9693), active against homologous and heterologous *Francisella* strains, as well as *Escherichia coli* ϕ and *E. coli* K12. The resulting preparations did not have a lytic effect on virulent and avirulent *F. tularensis* cultures.

Key words: *Francisella tularensis*, *Francisella*, bacteriophage

For citation: Tsimbalistova M.V., Pogozhova M.P., Tyurina A.V., Meloyan M.G., Pavlovich N.V. Studying the possibility of bacteriophage induction in natural and LPS-defective strains of tularemia and closely related francisella. Bacteriology. 2024; 9(2): 45–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-45-49

Туляремия является природно-очаговой инфекцией, эндемичные очаги которой широко распространены в Северном полушарии, в т.ч. в Российской Федерации. Возбудитель туляремии (*Francisella tularensis*) вызывает острое инфекционное заболевание человека и широкого круга животных. Эпизоотические вспышки инфекции разной степени интенсивности ежегодно выявляются на различных административных территориях нашей страны. Вид *F. tularensis* включает четыре подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica* и *novicida* [1]. Однако клиническое значение в патологии человека имеют только три основных подвида (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *mediasiatica* и *holarctica*), которые отличаются по ареалу циркуляции, биохимическим свойствам и патогенности для людей и животных. В то же время близкородственные франциселлы (*F. tularensis* subsp. *novicida* и *F. philomiragia*) могут вызывать туляремиеподобное заболевание только у людей со сниженным иммунным статусом.

Возбудитель туляремии относится к категории А наиболее опасных агентов биотерроризма [2–4]. Поэтому мониторинг состояния природных очагов, выделение культур возбудителя, их индикация и идентификация являются актуальными. Кроме того, особое значение имеют вопросы своевременной диагностики и назначения эффективной противомикробной терапии инфекции. В последние годы отмечается повышенный интерес исследователей к бактериофагам, которые могут быть использованы в профилактике, лечении и диагностике инфекции.

Попытки получения бактериофага туляремийного микроба предпринимались на протяжении многих лет разными исследователями. Например, А.А.Вольферц в 1935 г. показал, что фильтрат старой культуры со среды Мак-Коя образует негативные зоны на газоне туляремийных бактерий. После этого различные ученые изучали возможность индукции туляремийного бактериофага, причем некоторым удавалось регистрировать литическое действие микробных препаратов на индикаторные штаммы [5, 6]. Близкородственным франциселлам исследователи уделяют гораздо меньше внимания ввиду их незначительной роли в инфекционной патологии человека. Поэтому в литературе имеются лишь единичные сведения о наличии у них бактериофагов [7]. Вместе с тем авторы отмечают, что использованные методы плохо воспроизводились, а исследованные препараты были нестабильны. Весьма слабо изучен вопрос о феномене лизогении у франциселл. В то же время идея пополнить арсенал диагностических и лечебных средств против возбудителя туляремии за счет специфического бактериофага представляется нам заманчивой.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности выделения бактериофагов из культур *F. tularensis* трех основных подвигов, включая их изогенные авирулентные ЛПС-дефектные варианты, а также штаммов близкородственных франциселл.

Материал и методы

В работе использовали исходные вирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *tularensis* (AE-261 cap+), subsp. *mediasiatica* (543 cap+), subsp. *holarctica* (503 cap+), их изогенные авирулентные ЛПС-дефектные мутанты (cap-), вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, а также культуры близкородственных франциселл – *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112 и D9876) и *F. philomiragia* (F9693), *Escherichia coli* ϕ , *E. coli* K12. Все штаммы были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, где они хранились в лиофилизированном состоянии.

Культуры выращивали на плотной питательной среде Т [8] или модифицированной среде Мюллера–Хинтон (Himedia, Индия).

Изучение индукции бактериофагов проводили с использованием различных физических и химических факторов, таких как воздействие на суспензии бактерий (10^9 КОЕ/мл) различных температур (56°C в течение 30–60 мин, 4°C и 37°C в течение 1–3–7 дней), ультрафиолетового облучения (УФО) при разных дистанционных и временных режимах, хлороформа (в соотношении 1:10 с инкубацией 30 мин при комнатной температуре, постоянном встряхивании с последующим центрифугированием 4000 г 20 мин). Оценку литической активности отобранного супернатанта выполняли на плотных питательных средах либо с помощью спот-теста (прямого нанесения на чашки с индикаторными культурами), либо методом агаровых слоев по Грациа.

В качестве индикаторных штаммов были исследованы как гомологичные, так и гетерологичные штаммы туляремийного микроба, их изогенные авирулентные ЛПС-дефектные мутанты, франциселлы, а также *E. coli* ϕ , *E. coli* K12.

Для оценки содержания в полученных образцах бактериофагов и их морфологической характеристики использовали трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ). Строение корпускул бактериофагов изучали в электронном микроскопе Jeol JEM 1011. Препараты бактериофагов предварительно выдерживали в полиэтиленгликоле (24 ч), затем осаждали с помощью высокоскоростного центрифугирования, наносили на поверхность электронно-микроскопиче-

ской сеточки с формваровой (0,5%) подложкой, далее переносили на пленку и производили негативное контрастирование в 2%-м растворе уранилацетата в течение 1 мин. Приготовленные образцы фагов изучали в электронном микроскопе с увеличением в 80 000 раз.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования по индукции бактериофагов из природных вирулентных штаммов трех основных подвидов и их изогенных авирулентных ЛПС-дефектных мутантов с использованием различных индуцирующих факторов (температурный режим, обработка микробной суспензии хлороформом, УФО) выявить явление лизогении у *F. tularensis* и получить туляремийный бактериофаг с четко регистрируемой литической активностью нам не удалось. Тем не менее из вирулентного штамма среднеазиатского подвида при обработке бактерий хлороформом выделена субстанция, обладающая слабой литической активностью в отношении культур туляремийного микроба трех подвидов. Однако наши попытки размножить бактериофаг в бульоне с индикаторным штаммом были безуспешными, а его активность в процессе хранения быстро снижалась.

При изучении возможности индукции фагов у *F. novicida* (Utah 112 и D9876) и *F. philomiragia* с помощью обработки бактерий хлороформом были получены 3 субстанции, которые при их нанесении на родительские штаммы формировали четкие негативные зоны. Интересно отметить, что каждый из препаратов обладал перекрестной литической активностью в отношении всех изученных франциселл (рис. 1).

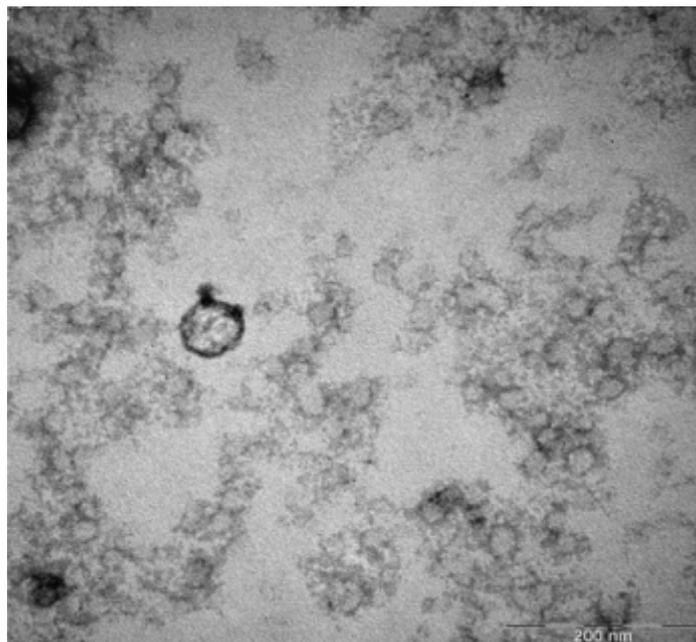


Рис. 2. Морфология франциселлезного бактериофага из *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112) в ТЭМ (увеличение в 80 000 раз).

Fig. 2. Morphology of Francisella bacteriophage from *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112) in TEM (80,000× magnification).

В то же время полученные препараты были не активны в отношении типичных штаммов возбудителя туляремии трех основных подвидов.

Как известно, прямым доказательством фаговой природы литической субстанции являются данные трансмиссионной электронной микроскопии. С этой целью полученные литические субстанции (бактериофаги или бактериоцины) изучены с помощью ТЭМ.

Исследование позволило визуализировать фаговые частицы, которые были представлены формами, характерными для бактериофагов семейства *Podoviridae*, имели одинаковое строение фаговых корпускул (полигональную головку и короткий отросток) и предположительно могут быть отнесены к III морфологической группе по классификации А.С.Тихоненко, семейству *C*, *Podoviridae* (рис. 2) [9].

Следующий этап включал изучение способности образовывать негативные бляшки при использовании в качестве индикаторных штаммов гетерологичные культуры *E. coli* φ и *E. coli* K12. Как оказалось, все выделенные препараты формировали на этих культурах четкие негативные пятна (рис. 3).

Следовательно, из лизогенных культур франциселл индуцированы активные бактериофаги, способные лизировать не только франциселлы, но и гетерологичные бактерии кишечной группы.

Установлено, что активность франциселлезных фагов (+4°C) сохраняется в течение 1 года 8 мес. (срок наблюдения).

Таким образом, при изучении феномена лизогении у штаммов туляремийного микроба и близкородственных франциселл из *F. novicida* и *F. philomiragia* были выделены умеренные бактериофаги. В противоположность этому зарегистрировать явление лизогении и индуцировать бактериофаги у возбудителя туляремии не удалось. В литических

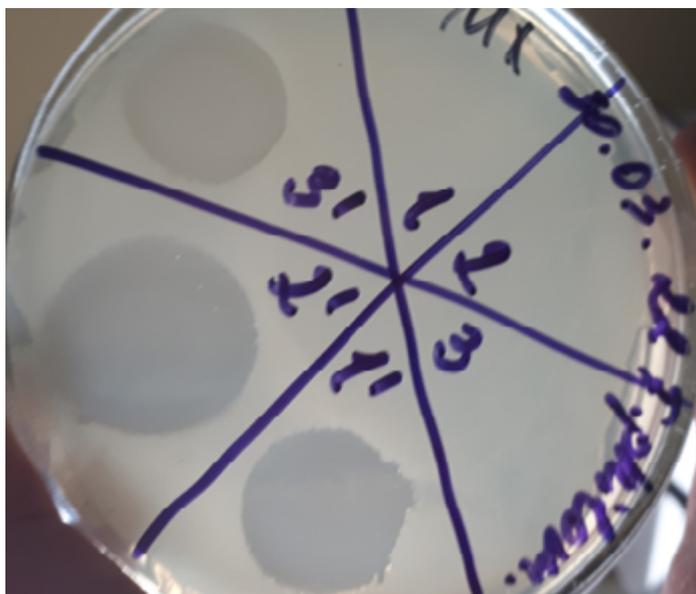


Рис. 1. Литическая активность в отношении индикаторного штамма *F. philomiragia* (F9693) препаратов, полученных из *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112), *F. tularensis* subsp. *novicida* (D9876) и *F. philomiragia* (F9693) при обработке бактерий УФО (1, 2, 3) и хлороформом (1', 2', 3').

Fig. 1. Lytic activity against the indicator strain *F. philomiragia* (F9693) of preparations obtained from *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112), *F. tularensis* subsp. *novicida* (D9876) and *F. philomiragia* (F9693) when treating bacteria with UVR (1, 2, 3) and chloroform (1', 2', 3').

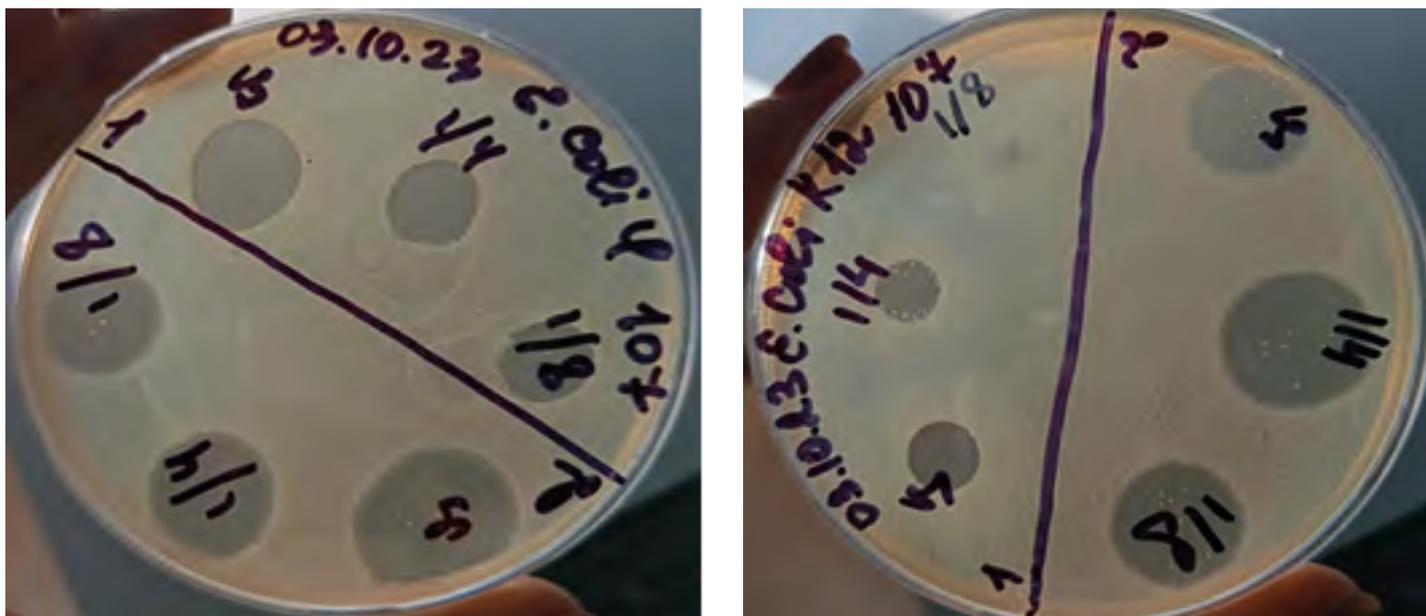


Рис. 3. Литическая активность бактериофага, выделенного из *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112) (цельный, в разведении 1/4 и 1/8) в отношении индикаторных штаммов *E. coli* φ и *E. coli* K12.

Fig. 3. Lytic activity of bacteriophage isolated from *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112) (whole, diluted 1/4 and 1/8) against indicator strains *E. coli* φ and *E. coli* K12.

субстанциях, изолированных из франциселл, обнаружены фаговые частицы, определена их морфологическая структура и специфичность.

В результате проведенного исследования получены стабильные препараты бактериофагов франциселл, обладающие литическим действием в отношении гомологичных штаммов и бактерий кишечной группы (*E. coli* φ и *E. coli* K12). В противоположность этому в отношении туляремийного микроба активность фагов не зарегистрирована.

Согласно данным литературы, важную роль в устойчивости бактерий к внедрению чужеродных генетических элементов (плазмиды, фаги и др.) играет CRISPR-Cas-система, которая определяет иммунитет микробной клетки [10]. При молекулярно-генетическом анализе *F. tularensis* subsp. *novicida* у бактерий были выявлены два функционирующих гена CRISPR-Cas9 и CRISPR-Cas12a [11]. В то же время у туляремийного микроба трех основных подвидов обнаруженные гены системы иммунитета предположительно неактивны [12]. Полученные нами данные не согласуются с результатами других авторов, т.к. культуры *F. novicida* и *F. philomiragia* были чувствительны к действию как гомологичных, так и гетерологичных франциселлезных бактериофагов. При этом штаммы туляремийного микроба проявляли резистентность к их литическому действию. Нельзя исключить, что обнаруженный феномен связан с особенностями бактериофагов франциселл.

Изолированные из *F. tularensis* subsp. *novicida* (Utah 112 и D9876) и *F. philomiragia* (F9693) стабильные препараты бактериофагов могут быть в дальнейшем полезными при изучении биологии туляремийного микроба и других франциселл.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Öhrman C, Sahl JW, Sjödin A, Uneklint I, Ballard R, Karlsson L, et al. Reorganized Genomic Taxonomy of *Francisellaceae* Enables Design of Robust Environmental PCR Assays for Detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms*. 2021 Jan 11;9(1):146. DOI: 10.3390/microorganisms9010146
- Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al.; Working Group on Civilian Biodefense. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001 Jun 6;285(21):2763-73. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763
- Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015 Feb;13(2):141-4. DOI: 10.1586/14787210.2015.986463
- Barel M, Charbit A. *Francisella tularensis*: Causative Agent of Tularemia and Biothreat Agent. In: Singh S, Kuhn J (eds). *Defense Against Biological Attacks*. Springer, Cham. 2019;239-250. DOI: 10.1007/978-3-030-03071-1_10
- Олсуфьев НГ. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975.
- Григорьев АА, Борисевич ИВ, Дармов ИВ, Бондарев ВП, Кузнецов СЛ, Миронин АВ, и др. Выделение и свойства туляремийного бактериофага ГАЛ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008;4(98):33-36. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-4(98)-33-36
- Köppen K, Prensa GI, Rydzewski K, Tlapák H, Holland G, Heuner K. First Description of a Temperate Bacteriophage (vB_FhiM_KIRK) of *Francisella hispaniensis* Strain 3523. *Viruses*. 2021 Feb 20;13(2):327. DOI: 10.3390/v13020327

8. Павлович НВ, Мишанькин БН. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиотики и медицинская биотехнология. 1987;32(2):133-137.
9. Ackermann HW. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol Sci. 1987 Jul;4(7):214-8.
10. Szczepankowska A. Role of CRISPR/cas system in the development of bacteriophage resistance. Adv Virus Res. 2012;82:289-338. DOI: 10.1016/B978-0-12-394621-8.00011-X
11. Ratner HK, Weiss DS. *Francisella novicida* CRISPR-Cas Systems Can Functionally Complement Each Other in DNA Defense while Providing Target Flexibility. J Bacteriol. 2020 May 27;202(12):e00670-19. DOI: 10.1128/JB.00670-19
12. Schunder E, Rydzewski K, Grunow R, Heuner K. First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*. Int J Med Microbiol. 2013 Mar;303(2):51-60. DOI: 10.1016/j.ijmm.2012.11.004

References

1. Öhrman C, Sahl JW, Sjödin A, Uneklint I, Ballard R, Karlsson L, et al. Reorganized Genomic Taxonomy of *Francisellaceae* Enables Design of Robust Environmental PCR Assays for Detection of *Francisella tularensis*. Microorganisms. 2021 Jan 11;9(1):146. DOI: 10.3390/microorganisms9010146
2. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al.; Working Group on Civilian Biodefense. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001 Jun 6;285(21):2763-73. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763
3. Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? Expert Rev Anti Infect Ther. 2015 Feb;13(2):141-4. DOI: 10.1586/14787210.2015.986463
4. Barel M, Charbit A. *Francisella tularensis*: Causative Agent of Tularemia and Biothreat Agent. In: Singh S, Kuhn J (eds). Defense Against Biological Attacks. Springer, Cham. 2019;239-250. DOI: 10.1007/978-3-030-03071-1_10
5. Olsuf'ev NG. Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vzbuditelya tulyaremii. M.: Meditsina Publ., 1975. (In Russian).
6. Grigor'ev AA, Borisevich IV, Darmov IV, Bondarev VP, Kuznetsov SL, Mironin AV, et al. Isolation of GAL tularemia bacteriophage and its characteristics. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;4(98):33-36. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-4(98)-33-36 (In Russian).
7. Köppen K, Prensa GI, Rydzewski K, Tlapák H, Holland G, Heuner K. First Description of a Temperate Bacteriophage (vB_FhiM_KIRK) of *Francisella*

- hispaniensis* Strain 3523. Viruses. 2021 Feb 20;13(2):327. DOI: 10.3390/v13020327
8. Pavlovich NV, Mishan'kin BN. Prozrachnaya pitatel'naya sreda dlya kul'tivirovaniya *Francisella tularensis*. Antibiotiki i meditsinskaya biotekhnologiya. 1987;32(2):133-137. (In Russian).
9. Ackermann HW. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol Sci. 1987 Jul;4(7):214-8.
10. Szczepankowska A. Role of CRISPR/cas system in the development of bacteriophage resistance. Adv Virus Res. 2012;82:289-338. DOI: 10.1016/B978-0-12-394621-8.00011-X
11. Ratner HK, Weiss DS. *Francisella novicida* CRISPR-Cas Systems Can Functionally Complement Each Other in DNA Defense while Providing Target Flexibility. J Bacteriol. 2020 May 27;202(12):e00670-19. DOI: 10.1128/JB.00670-19
12. Schunder E, Rydzewski K, Grunow R, Heuner K. First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*. Int J Med Microbiol. 2013 Mar;303(2):51-60. DOI: 10.1016/j.ijmm.2012.11.004

Информация о соавторах:

Погожова Марина Павловна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Тюрина Анна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Мелоян Мисак Геворгович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и.о. начальника отдела природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Marina P. Pogozhova, Junior Researcher at the Laboratory of Bacteriophages, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Anna V. Tyurina, Junior Researcher at the Laboratory of Bacteriophages, Rostov-on-Don Anti-plague Research Institute of Rosпотребнадзор

Misak G. Meloyan, Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Natalya V. Pavlovich, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Acting Head of the Department of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Анализ микробиома при метастатическом раке

Микробные сообщества обитают во многих нишах человеческого тела и являются важными модуляторами иммунной системы хозяина и реакции на противораковую терапию. Недавние исследования показали, что в первичных опухолях присутствуют сложные микробные сообщества. Чтобы исследовать наличие и значимость микробиома в метастазах, объединили метагеномику, геномику, транскриптомику и клинические данные 4160 биопсий метастатических опухолей на основе картирования и сборки. Выявили органоспецифический тропизм микробов, обогащение анаэробными бактериями в гипоксических опухолях, связь между микробным разнообразием и инфильтрирующими опухоль нейтрофилами, а также связь фузобактерий с устойчивостью к блокаде иммунных контрольных точек (ICB) при раке легких. Кроме того, продольный отбор проб опухолей выявил временную эволюцию микробных сообществ и идентифицировал бактерии, истощенные при ICB. Вместе мы создали панраковый ресурс метастатического опухолевого микробиома, который может способствовать развитию стратегий лечения.



Battaglia TW, Mimpfen IL, Traets JJH, van Hoeck A, Zevenrijn LJ, Geurts BS, et al.
A pan-cancer analysis of the microbiome in metastatic cancer.
Cell. 2024 Apr 25;187(9):2324-2335.e19. doi: 10.1016/j.cell.2024.03.021

Современные способы оценки влияния внешних факторов на физиологическое состояние бактериальной клетки

С.В.Борисова¹, О.А.Волох¹, Л.В.Коломбет², Р.Р.Салихов¹

¹ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация;

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

Обзор посвящен методам изучения взаимодействия бактериальной клетки со стресс-факторами на различных уровнях организации биосистем: популяционном, клеточном и молекулярном. Рассматриваются как стандартные методы изучения бактериальных клеток и клеточных популяций, так и современные техники, которые позволяют глубже понять механизмы адаптации микроорганизмов к переменным условиям окружающей среды.

Ключевые слова: адаптация, реакция на стресс, молекулярно-генетические методы, электрооптический анализ, физиологическое состояние бактериальной клетки

Для цитирования: Борисова С.В., Волох О.А., Коломбет Л.В., Салихов Р.Р. Современные способы оценки влияния внешних факторов на физиологическое состояние бактериальной клетки. Бактериология. 2024; 9(2): 50–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-50-57

Modern methods for assessing the influence of external factors on the physiological state of a bacterial cell

S.V.Borisova¹, O.A.Volokh¹, L.V.Colombet², R.R.Salikhov¹

¹Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;

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

The review is dedicated to methods for studying the interaction of bacterial cells with stress factors at various levels of biosystem organization: population, cellular and molecular. Both standard methods for studying bacterial cells and cell populations are considered, as well as modern techniques that allow a deeper understanding of the mechanisms of adaptation of microorganisms to variable environmental conditions.

Key words: adaptation, stress response, molecular genetic methods, electro-optical analysis, physiological state of a bacterial cell

For citation: Borisova S.V., Volokh O.A., Colombet L.V., Salikhov R.R. Modern methods for assessing the influence of external factors on the physiological state of a bacterial cell. Bacteriology. 2024; 9(2): 50–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-50-57

Исследование влияния внешних факторов, естественных и искусственных экосистем, организма-хозяина на бактериальные клетки необходимо для понимания жизнедеятельности микроорганизмов, определения их функциональной активности, анализа взаимосвязи с окружающей средой и имеет важное прикладное значение. Так, например, изучение влияния антибиотиков на бактерии помогает разрабатывать более эффективные методы лечения инфекций, управления бактериальными заболеваниями [1], а также предотвращать негативное воздействие антибактериальных препаратов на микробиом человека и животных [2].

Исследование взаимодействия макроорганизма с бактериальными клетками в экологических сообществах помогает предсказывать экологические проблемы и бороться с ними [3]. Понимание того, какие факторы способствуют росту и размножению бактерий, играет ключевую роль в биосинтезе полезных молекул и других биотехнологических процессах [4–6].

Таким образом, исследование влияния внешних факторов на бактериальные клетки является актуальным направлением и обладает широким спектром применений, что делает его важной областью научных исследований.

Для корреспонденции:

Борисова Светлана Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 5154-46, доб. 3-82

Статья поступила 10.01.2024, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Svetlana V. Borisova, Junior Researcher of the Laboratory of Cholera Vaccines of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 5154-46, ad. 3-82

The article was received 10.01.2024, accepted for publication 28.06.2024

Цель работы – обобщить современные данные о методах изучения ответа бактерий на стресс-условия на популяционном, клеточном и молекулярном уровнях.

Культурально-морфологические методы

Одним из ключевых параметров физиологического состояния бактериальных клеток является их способность к росту и размножению. В настоящее время для оценки прироста числа клеток используются микробиологические счетчики или определение оптической плотности (ОП) культуры.

Золотым стандартом длительное время является культивирование микроорганизмов на поверхности питательного агара [7]. Определение степени воздействия того или иного фактора на микроорганизм оценивается по жизнеспособности в качественном или количественном соотношении. Также в ходе инкубации проводят наблюдение за изменением удельной скорости роста, морфологии колоний, их цвета и т.д. Однако, несмотря на широкое использование этого метода, его нельзя считать универсальным, поскольку 95% всех культивируемых и представленных в публикациях видов относятся всего к 5 из 53 признанных типов бактерий [8]. Кроме того, давно известно, что микробные клетки могут существовать в некультивируемых формах [9], или в предгибельном состоянии [10, 11], при которых они не будут образовывать колонии на питательных средах, но могут обладать другой активностью, например, метаболической. Все это говорит о том, что важно использовать методы, которые позволяют не только оценивать жизнеспособность микроорганизма с точки зрения «живой/мертвый», но и изучать иные показатели бактериальных клеток.

Для определения концентрации клеток в питательной среде, как показателя жизнеспособности, давно используются спектроскопические методы, основанные на взаимодействии электромагнитных волн с молекулами или веществом [12]. При этих методах не требуются дополнительные реагенты, поэтому они перспективны в качестве неинвазивных методов определения жизнеспособности *in situ* [13]. Поскольку клеточные культуры обладают определенными оптическими свойствами, которые косвенно отражают их состояние, результаты применения метода можно использовать как показатель жизнеспособности. В случае бактериальной культуры ОП, измеренная при 600 нм, обусловлена эффектом светорассеяния, который, в свою очередь, в определенном диапазоне прямо пропорционален концентрации клеток в среде. Помимо измерения ОП суспензии бактерий в видимом спектре излучения, возможно также определение светопоглощающих характеристик суспензии клеток в ультрафиолетовом диапазоне (260 нм, 280 нм и пр.) в зависимости от исследовательских задач. Спектроскопия является одним из стандартных методов, используемых для оценки концентрации клеток в суспензии, а также для количественного определения субстратов, метаболитов или других соединений в культуральном бульоне, таких как белки или нуклеиновые кислоты [14].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) за счет возможности получения изображений с высоким разрешением позволила проводить исследования в области клеточной и молекулярной биологии. Принцип АСМ основан на регистрации межмолекулярных взаимодействий вещества. В результате можно получить объемный рельеф поверхности исследуемой клетки

с разрешением примерно 0,1–1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали [15]. АСМ помогает детально рассмотреть оболочки микробных клеток и их изменения при различных воздействиях. Эксперименты, проводящиеся с использованием АСМ, позволяют наблюдать распределение рецепторов на поверхности клетки, силу и динамику их взаимодействий с лигандами, а также эластичность и адгезивность бактериальных ворсинок. Визуализация методом АСМ позволяет наблюдать за воздействием лекарств или других противомикробных соединений на ультраструктуру клеточной поверхности [16], а также ответить на ключевые вопросы, например, являются ли вызванные антимикробными препаратами изменения ультраструктуры поверхности результатом их прямого действия или это косвенная реакция на стресс [17, 18].

Электронная микроскопия (ЭМ) подразумевает использование электронов, взаимодействующих с микроскопическим объектом, вместо видимого света для получения изображений. С помощью метода сканирующей зондовой микроскопии изучаются воздействия на микробные клетки таких условий, как низкие температуры [19], сфинголипиды [20], биопленки бактериальных клеток [21]. В настоящее время ЭМ применяется для исследования широкого спектра микроорганизмов, но, к сожалению, данный метод трудно назвать простым и легкодоступным. Это связано в первую очередь со стоимостью самого оборудования и отсутствием большого количества специалистов в данной области [22].

Электрооптический анализ

Одним из перспективных направлений изучения жизнеспособности клеток является электрооптический (ЭО) анализ. Метод основан на исследовании клеток как электрофизических объектов со слоистой структурой и измерении поляризационных характеристик клеточных структур, которые изменяются в зависимости от различных физиологических состояний клетки: форма клетки, взаимодействие с антибиотиками, антителами, фагами, метаболическая активность [23].

Работы по исследованию возможностей применения метода ЭО-анализа в прикладной микробиологии начались с середины 1970-х гг. Первоначально метод был использован для оценки ферментативной активности микробных клеток и определения токсичных субстратов [24]. Возможности метода были продемонстрированы для детекции взаимодействия между микробными клетками и бактериофагами [25], а также для анализа чувствительности к антибактериальным препаратам [26] и дезинфицирующим средствам [27]. Описана возможность применения ЭО-анализа на этапах культивирования, подготовки биомассы, получения и хранения лиофилизата экспериментальной живой туляремийной вакцины [28].

ЭО-анализ можно также использовать для исследования изменений электрофизических и морфометрических параметров клетки. Была показана возможность использования результатов электрооптических измерений для оперативного определения изменения числа неповрежденных клеток до и после внешних экстремальных воздействий – толуола, теплового воздействия, этилового спирта, замораживания. В результате проведенных исследований было показано, что электрооптические измерения позволяют оценивать относительное количество клеток как с летальными, так и с сублетальными повреждениями, при этом точность определения

относительного числа неповрежденных клеток составляет 3–5% [29].

Измерение дзета-потенциала

Поверхностный заряд клетки – это физико-химическое свойство, связанное с составом клеточной оболочки, и этот параметр играет важную роль во взаимодействии бактерий с ионами, частицами и поверхностями. Заряд клеточной поверхности влияет на поступление метаболитов в клетки и взаимодействие бактерий с клеточными рецепторами, экспонируемыми принимающими клетками [30]. В нормальных условиях бактерии имеют отрицательный поверхностный заряд, однако окружающая среда может влиять на поверхностный заряд клеток бактерий, который изменяет степень взаимодействия бактерий с внешними поверхностями [31]. Дзета-потенциал, также известный как электрокинетический потенциал, определяется суммарным электрическим зарядом молекул, находящихся на поверхности клетки, и является косвенным методом оценки поверхностного потенциала бактерий. Он играет доминирующую роль в адгезии бактерий к поверхностям субстрата и в их взаимодействии с факторами окружающей среды. Корреляция между дзета-потенциалом и физиологическим состоянием бактерий может использоваться для характеристики повреждений бактериальной структуры в результате различных факторов стресса окружающей среды, таких как изменения температуры и добавление этанола [32]. Z.Saifi et al. показали, что изменение дзета-потенциала в сокультурах коррелировало с повышением или снижением чувствительности к антибиотикам [33]. Поскольку возможно использовать измерения дзета-потенциала для определения физиологического состояния бактерий, этот метод применяется для характеристики различных противомикробных соединений. При изучении механизма их взаимодействия было показано, что изменение электрокинетического потенциала может быть объяснено двумя различными явлениями: повреждением бактерий или связыванием антимикробных препаратов с поверхностью бактерий [34]. Таким образом, описанные исследования показывают, что измерения дзета-потенциала являются очень полезным инструментом для изучения стресс-воздействий на бактериальные клетки, а учитывая простоту и воспроизводимость этого метода, он все чаще используется для оценки и сравнения природы поверхностных взаимодействий между клетками и окружающей средой [35].

Методы колориметрии и флюорометрии

Колориметрические методы являются одними из часто используемых методов для определения структурной целостности клетки. Маркерами жизнеспособности в этой группе методов является, например, восстановление красителя (тетразолий, реазурин) или его флюоресценция (AlamarBlue, SYTO 9, пропидий йодид) [36, 37]. Далее, соотношение окрашенных/неокрашенных клеток или изменения окраски/интенсивности определяют с помощью микроскопии или флюоресцентной спектроскопии, что обеспечивает более высокую пропускную способность. Так, с помощью этого метода было определено физиологическое состояние клеток *Sinorhizobium meliloti*, а также доказано наличие в образцах интактных, но некультивируемых клеток после высушивания и хранения [38].

Аналогичные красители используются также и в проточной цитометрии [39]. Данный метод широко применяется для исследования отдельных клеток, а за счет использования комбинаций спектрально различных флюоресцентных зондов позволяет провести количественную оценку разных характеристик клетки (метаболическая активность, содержание РНК и/или ДНК, проницаемость мембраны и т.д.) [40]. В отличие от планшетного метода, проточная цитометрия обеспечивает поклеточный анализ [41], тем самым позволяя точно определить соотношение живых и мертвых клеток. А за счет автоматизации процесса и метода обработки, в сравнении с микроскопией, в секунду могут анализироваться тысячи клеток [42]. Однако, несмотря на возможность исследовать большое количество параметров, пробоподготовка специфична и трудоемка, что вносит ограничения в работу с этим методом.

Недавние достижения в области наноматериалов позволили создать новый класс флюоресцентных меток – квантовые точки. За счет их биосовместимости, размерного сходства с биологическими макромолекулами (например, нуклеиновыми кислотами и белками), и улучшенными фотофизическими и спектральными свойствами (высокой яркостью и устойчивостью к фотообесцвечиванию), сопровождающиеся широким спектром возбуждения и узким спектром излучения делают квантовые точки идеальными флюорофорами для сверхчувствительных, многоцветных и мультиплексирующих применений в молекулярной биотехнологии и биоинженерии [43]. Так, например, антитела и фрагменты неферментативной ДНК, конъюгированные квантовыми точками разного спектра излучения, позволяют идентифицировать различные микроорганизмы в сложных смесях, например, в культуре клеток или в биоматериалах, полученных от человека и животных [44–46].

Генно-модифицированные штаммы

Определение взаимодействий между биомолекулами в живых клетках позволяет лучше понять механизмы ответа микроорганизмов на стрессовые условия. Для этого широко используют методы молекулярной визуализации, главным элементом которых является применение специальных молекулярных биосенсоров, в частности флюоресцентных белков, которые не нарушают процессов жизнедеятельности клетки и не приводят к фатальным биологическим изменениям [47]. Данные белки обладают характеристиками, которые делают их полезным для исследований локализации у бактерий, в первую очередь способностью флюоресцировать при соединении с полипептидами-мишенями без добавления экзогенных субстратов. Использование нескольких вариантов таких белков позволяет маркировать множество компонентов в пределах одной клетки [48]. Флюоресцентные штаммы все чаще используются в качестве ценных инструментов для оценки экспрессии генов в неблагоприятных условиях [49], изучения биопленок [50], количественной оценки бактериальной нагрузки *in vitro* и *in vivo* [51–53]. Другие интересные применения включают использование флюоресцентных штаммов в качестве индикаторов при анализе обсемененности продуктов [54].

Бактерии, помеченные плазмидами, продуцирующими флюоресцентный белок, могут быть обнаружены несколькими методами. Наиболее простым методом является флюорес-

центная микроскопия [55], а для обнаружения флуоресценции внутри макроорганизма, используется визуализация с помощью томографии [56].

Однако данный метод имеет свои недостатки. Например, для образования хромофора требуется молекулярный кислород, и все виды флуоресцентных белков хуже работают при повышенных температурах роста [57]. Следовательно, их нельзя использовать при всех условиях роста, при которых обычно растут микроорганизмы. Кроме того, белки должны экспрессироваться в достаточном количестве, поскольку обнаружение всего нескольких молекул флуорофоров технически сложно, а результаты легко неверно истолковать.

Методы протеомного анализа

Методы протеомного анализа используются для определения взаимодействий, происходящих между организмом хозяина и микроорганизмом на молекулярном уровне. Чаще всего это определение структурно-функциональных характеристик белков и пептидов либо количественное измерение содержания белков в клетках или тканях. Данный метод помогает решить множество задач: идентифицировать маркеры инфекционных заболеваний, найти белковые антигены – кандидаты на роль вакцин, определить механизмы патогенности и влияние различных факторов на экспрессию белков в макро- или микроорганизмах [58].

Множество исследований посвящено качественному и количественному определению антиоксидантных белков, экспрессирующихся при взаимодействии микроорганизма и макроорганизма (растение, животное, человек) [59–61].

Описан способ сравнительного анализа протеома у бактерий-симбионтов риса до и после воздействия осмотического стресса. Показано, что наиболее эффективные продуценты стресс-белков сильнее подавляют рост патогенных микроорганизмов [62].

В большинстве исследований, посвященных изучению протеома микроорганизмов, для разделения и идентификации белков используются одномерный и двухмерный электрофорез [63, 64] или жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) [65]. Все эти методы обычно требуют длительных этапов подготовки образца и ограничены диапазоном обнаружения (размер 10–200 кДа) [66].

Современной альтернативой вышеуказанным методам является MALDI-TOF-MS. К преимуществам этой технологии можно отнести отсутствие длительной подготовки образцов и способность надежно идентифицировать изменения в части бактериального протеома [67]. Она также успешно используется для комплексного протеомного анализа реакции на стресс [68].

Изучение метаболома – полного набора метаболитов, вырабатываемых бактериальной клеткой, – отражает ферментативные пути, закодированные в геноме. Кроме того, весь состав метаболитов отражает взаимодействие процессов развития и меняющейся окружающей среды на протяжении всей жизни организма. Отслеживая глобальные последствия различных факторов, действующих на клетку, метаболомика может обеспечить более точную картину фактического физиологического состояния организма. В основном метаболомика микроорганизмов изучается со стороны ассоциаций микробного метаболома с людьми, с экологическими экосистемами [69].

Молекулярно-генетические методы

Широко используемый в последние десятилетия метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для детекции и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний стал мощным инструментом в т.ч. и для исследования экспрессии так называемых стресс-генов бактериальных клеток [70, 71]. Анализ экспрессии генов методом ПЦР с обратной транскрипцией позволяет оценивать, какие гены активны в конкретных условиях. Наиболее эффективными генами для исследования данным методом являются гены-регуляторы метаболизма и гены, кодирующие стресс-белки. Количественный анализ позволяет изучать уровень экспрессии конкретных генов на основе количества продуктов РНК [72, 73].

Но классические методы ПЦР не дифференцируют ДНК жизнеспособной бактериальной клетки от инактивированной или от свободного фрагмента ДНК. В настоящее время разработаны альтернативные ПЦР-методы, которые применяются для исследования воздействия внешних факторов на бактериальные клетки через анализ экспрессии генов, кодирующих метаболические ферменты [74]. К ним относится так называемый метод «ПЦР жизнеспособности» (Viability PCR/vPCR) [75], разработанный для быстрого количественного определения жизнеспособных клеток с использованием интеркалирующих ДНК красителей, таких как моноазид этидия и моноазид пропидия (РМА) [76]. При использовании vPCR микробы в образцах инкубируются с мембранопроницающим реагентом. При фотоактивации РМА плотно связывается с экспонированной ДНК и препятствует ПЦР-амплификации. Нежизнеспособные клетки с поврежденными мембранами и свободными нуклеиновыми кислотами не защищены от воздействия реагента, и их амплификация ингибируется после фотоактивации комплекса реагент-ДНК. Напротив, жизнеспособные клетки с неповрежденными клеточными мембранами не связываются с РМА, что позволяет регистрировать сигналы от них в количественном ПЦР (qPCR) [77]. Недавно разработанный ДНК-интеркалирующий краситель DyeTox13 позволяет избирательно обнаруживать только жизнеспособные клетки, обладающие ферментативной активностью. Связываясь с нуклеиновыми кислотами мертвых и ферментативно неактивных клеток, DyeTox13 предотвращает ПЦР-амплификацию, в то время как нуклеиновые кислоты метаболически активных клеток могут быть амплифицированы ПЦР-полимеразой, поскольку активность фермента внутриклеточной эстеразы расщепляет краситель [78, 79].

Транскриптомика – одна из самых быстро развивающихся областей знания, по крайней мере, в технологическом смысле. Транскриптомный анализ используется для решения многих задач, таких как определение локализации участков начала транскрипции, количественный анализ уровня транскриптов на различных стадиях развития клетки и при неблагоприятных условиях. В отличие от генома, который, как правило, одинаков для всех клеток одной линии, транскриптом может сильно меняться в зависимости от условий окружающей среды, отражает профиль экспрессии генов в данный момент времени. Более того, транскриптомный анализ позволяет исследовать так называемые гены немедленного и раннего ответа (immediate-early genes). Экспрессия таких генов может активироваться непосредственно после добавления индуктора, когда содержание белкового продукта не

Таблица. Методы исследования влияния внешних факторов на физиологическое состояние бактериальной клетки
Table. Methods for studying the influence of external factors on the physiological state of a bacterial cell

Уровень исследования / Research level	Метод / Research level	Ссылки / Reference
Популяционный / Populational	Бактериологический / Bacteriological	7, 10, 11
	Спектроскопические методы / Spectroscopic methods	12, 13, 14
	Световая и флуоресцентная микроскопия / Light and fluorescence microscopy	2, 5, 36, 37, 48–56
Клеточный / Cellular	Электрооптический анализ / Electro-optical analysis	23–29
	Квантовые точки / Quantum dots	43–46
	Проточная цитометрия / Flow cytometry	2, 39–42
	Измерение дзета-потенциала / Measurement of the ζ -potential	31–35
	Электронная микроскопия / Electron microscopy	19–22
	Атомно-силовая микроскопия / Atomic force microscopy	15–18
Субклеточный/ Молекулярный Subcellular/ Molecular	Полимеразная цепная реакция / Polymerase chain reaction	3, 5, 70–83
	Протеомика / Proteomics	58–65, 68
	Метабомика / Metabolomics	69

меняется вследствие низкой скорости трансляции [80]. Проведенные транскриптомные исследования на цианобактериях рода *Synechocystis* показали, что существуют универсальные химические или электрические стимулы – активные формы кислорода и изменения окислительно-восстановительного потенциала, которые запускают экспрессию стресс-зависимых генов независимо от природы самого стресса [81]. При оценке взаимодействия бактерий с организмом хозяина данный метод также играет немаловажную роль. K.S.Kim et al. определили, что муцинразрушающие бактерии (*Akkermansia muciniphila* и *Ruminococcus gnavus*) тесно связаны со здоровьем макроорганизма и его болезненными состояниями. Изменение рациона питания лабораторных животных приводило к изменению метаболических путей микроорганизмов, что нарушало целостность кишечного барьера организма-хозяина [82]. Данный метод также используется для определения зависимости стресса, воздействующего на бактериальную клетку, и ее дальнейшей устойчивости к антибиотикам [83].

Заключение

Исследование стресс-реакций играет ключевую роль в понимании адаптационных механизмов бактерий к переменным условиям окружающей среды. Методы, позволяющие исследовать эти взаимодействия, довольно обширны и затрагивают различные уровни бактериальной клетки. Методы популяционного уровня – световая микроскопия, оптические методы, бактериологический метод – позволяют оценить

ответ всей популяции на вредное воздействие окружающей среды. Методы, оценивающие взаимодействие конкретной клетки с окружающей средой, являются более чувствительными и, следовательно, более информативными. Некоторые из методов (АСМ, электронная микроскопия, электрооптический анализ) помогают также изучить и морфологические характеристики клеток. Методы молекулярной биологии позволяют анализировать изменения в генетической информации под воздействием стресс-факторов и более глубоко и точно изучать изменения в геноме бактерий. Особое внимание следует уделить протеомным методам анализа, которые позволяют анализировать изменения в уровне продукции определенных белков при стрессовых условиях. Эти методы предоставляют более полное представление о реакциях бактерий на стресс.

Таким образом, современные техники анализа стресс-реакций в бактериальных клетках предоставляют мощные инструменты для более глубокого понимания молекулярных механизмов адаптации организмов к переменным условиям окружающей среды, что открывает новые перспективы в биологии и медицине (таблица).

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 interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Abullais Saquib S, Abdullah AlQahtani N, Ahmad I, Arora S, Mohammed Asif S, Ahmed Javali M, et al. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. *J Infect Dev Ctries.* 2021 Nov 30;15(11):1685-1693. DOI: 10.3855/jidc.14904
- Maier L, Goemans CV, Wirbel J, Kuhn M, Eberl C, Pruteanu M, et al. Unravelling the collateral damage of antibiotics on gut bacteria. *Nature.* 2021;599(7883):120-124. DOI: 10.1038/s41586-021-03986-2
- Renoud S, Vacheron J, Abrouk D, Prigent-Combaret C, Legendre L, Muller D, et al. Field Site-Specific Effects of an Azospirillum Seed Inoculant on Key Microbial Functional Groups in the Rhizosphere. *Front Microbiol.* 2022;12:760512. DOI: 10.3389/fmicb.2021.760512
- Салихов PP, Борисова СВ, Авдеева НГ, Самохвалова ЮИ, Волох ОА. Оптимизация условий культивирования *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе получения клеточной массы. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;4:137-142. / Salikhov RR, Borisova SV, Avdeeva NG, Samokhvalova Yul, Volokh OA. Optimization of the Conditions for Cultivation of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Process of Obtaining Cell Mass. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142 (In Russian).
- Juntachai W, Chaichompoo A, Chanarat S. Ambient pH regulates secretion of lipases in *Malassezia furfur*. *Microbiology (Reading).* 2020;166(3):288-295. DOI: 10.1099/mic.0.000879
- Kanno M, Tamaki H, Mitani Y, Kimura N, Hanada S, Kamagata Y. pH-induced change in cell susceptibility to butanol in a high butanol-tolerant bacterium, *Enterococcus faecalis* strain CM4A. *Biotechnol Biofuels.* 2015;8:69. DOI: 10.1186/s13068-015-0251-x

7. Hattori T. The viable count: quantitative and environmental aspects. Springer-Verlag, Berlin, Germany; 1988.
8. Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):141-50. DOI: 10.1038/nrmicro819
9. Dedysh SN. Describing difficult-to-culture bacteria: Taking a shortcut or investing time to discover something new? *Syst Appl Microbiol.* 2023;46(5):126439. DOI: 10.1016/j.syapm.2023.126439
10. Postgate JR. Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress. *Adv Microb Physiol.* 1967;1:1-23.
11. Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994 Nov;13(11):908-14. DOI: 10.1007/BF02111491
12. Leme J, Fernández Núñez EG, de Almeida Parizotto L, Chagas WA, Salla dos Santos E, Tojeira Prestia Caricati A, et al. A multivariate calibration procedure for UV/VIS spectrometric monitoring of BHK-21 cell metabolism and growth. *Biotechnol Prog.* 2014;30(1):241-8. DOI: 10.1002/btpr.1847
13. Ulber R, Frerichs JG, Beutel S. Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Anal Bioanal Chem.* 2003;376(3):342-8. DOI: 10.1007/s00216-003-1930-1
14. Beutel S, Henkel S. In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(6):1493-505. DOI: 10.1007/s00253-011-3470-5
15. Alsteens D, Müller DJ, & Dufréne, YF. Multiparametric atomic force microscopy imaging of biomolecular and cellular systems. *Accounts of Chemical Research.* 2017;50:924-931. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00638
16. Nievergelt AP, Banterle N, Andany SH, Gönczy P, Fantner GE. High-speed photothermal off-resonance atomic force microscopy reveals assembly routes of centriolar scaffold protein SAS-6. *Nature Nanotechnology.* 2018;13:696-701. DOI: 10.1038/s41565-018-0149-4
17. Dufréne YF, Viljoen A, Mignolet J, Mathelié-Guinlet M. AFM in cellular and molecular microbiology. *Cell Microbiol.* 2021;23(7):e13324. DOI: 10.1111/cmi.13324
18. Ерохин ПС, Коннов НП, Заднова СП, Бугоркова ТВ. Динамическая характеристика микроорганизмов в условиях неблагоприятного действия факторов абиотической природы методом сканирующей зондовой микроскопии. *Вестник Саратовского государственного технического университета.* 2015;1(81):23-28. / Erokhin PS, Konnov NP, Zadnova SP, Bugorkova TV. Dynamic characteristics of microorganisms under adverse impact of abiotic agents by means of the scanning probe microscope. *Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta.* 2015;1(81):23-28. (In Russian).
19. Болотский МН. Изучение воздействия на популяцию бактерий рода *Listeria* низких температур (сканирующая электронная микроскопия). Актуальные проблемы современной науки. 2007;6(38):144-146. / Bolotsky MN. Izuchenie vozdeistviya na populyatsiyu bakterii roda *Listeria* nizkikh temperatur (skaniruyushchaya elektronnaya mikroskopiya). *Aktual'nye problemy sovremennoi nauki.* 2007;6(38):144-146. (In Russian).
20. Peters S, Kaiser L, Fink J, Schumacher F, Perschin V, Schlegel J, et al. Click-correlative light and electron microscopy (click-AT-CLEM) for imaging and tracking azido-functionalized sphingolipids in bacteria. *Sci Rep.* 2021;22:11(1):4300. DOI: 10.1038/s41598-021-83813-w
21. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a000398. DOI: 10.1101/cshperspect.a000398
22. Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron.* 2006;37(2):91-106. DOI: 10.1016/j.micron.2005.10.001
23. Zhivkov AM, Gyurova AY. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008 Oct 15;66(2):201-5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007
24. Ignatov OV, Gulyi OI, Bunin VD, Voloshin AG, O'Neil D, Ivnitcki D. Detection of microbial cells with electrooptical analysis. *Defense against Bioterror.* 2004;147-163.
25. Гулий ОИ, Маркина ЛН, Игнатов ВВ, Игнатов ОВ. Определение фагоустойчивости микробных клеток *E. coli* с помощью метода электрооптического анализа клеточных суспензий. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2010;3:47-49. / Gulyi OI, Markina LN, Ignatov VV, Ignatov OV. Determination of phage resistance of *E. coli* cells with electrooptical analysis of cell suspensions. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika).* 2010;3:47-49. (In Russian).
26. Гулий ОИ, Бунин ВД, Игнатов ОВ. Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки. *Антибиотики и химиотерапия.* 2016;61(3-4):3-13. / Gulyi OI, Markina LN, Ignatov VV, Ignatov OV. Determination of phage resistance of *e. Coli* cells with electrooptical analysis of cell suspensions. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2016;61(3-4):3-13. (In Russian).
27. Иванов АЮ. Исследование изменений электроориентации клеток *E. coli* при действии дезинфектантов. *Микробиология.* 1985;54(5):826-829. / Ivanov AYU. Investigation of changes in the electrical orientation of *E. coli* cells under the action of disinfectants. *Microbiology.* 1985;54(5):826-829. (In Russian).
28. Волох ОА, Борисова СВ, Бибииков ДН, Кузнецова ЕМ, Самохвалова ЮИ, Авдеева НГ, и др. Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020;3:50-55. / Volokh OA, Borisova SV, Bibikov DN, Kuznetsova EM, Samokhvalova Yul, Avdeeva NG, et al. Electro-optical analysis of cell viability of a vaccine strain of tularemia microbe. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2020;3:50-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55 (In Russian).
29. Игнатов СГ. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ГНЦ ПМБ, 2007. / Ignatov SG. Electro-optical analysis in microbiology. Serpukhov: FGUN SSC PMB, 2007. (In Russian).
30. Bar-Even A, Noor E, Flamholz A, Buescher JM, Milo R. Hydrophobicity and charge shape cellular metabolite concentrations. *PLoS Comput Biol.* 2011;7(10):e1002166. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002166
31. Дятлов ИА, Филиппов АФ, Терентьев СА. Роль поверхностных клеточных структур чумного микроба в адгезии. Актуальные проблемы и задачи биохимии, диагностики и иммунопрофилактики особо опасных инфекций. 1991;12-18. / Dyatlov IA, Filippov AF, Terentyev SA. The role of surface cellular structures of the plague microbe in adhesion. *Current problems and tasks of biochemistry, diagnosis and immunoprophylaxis of particularly dangerous infections.* 1991;12-18. (In Russian).
32. Bravo-Ferrada BM, Gonçalves S, Semorile L, Santos NC, Tymczyszyn EE, Hollmann A. Study of surface damage on cell envelope assessed by AFM and flow cytometry of *Lactobacillus plantarum* exposed to ethanol and dehydration. *J Appl Microbiol.* 2015;118:1409-1417. DOI: 10.1111/jam.12796
33. Saifi Z, Singh U, Kumar M, Daya KS, Alocilja EC. Study of inter-species social interactions among bacterial cells using computer vision and zeta potential analysis. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2023;22(3):637-646. DOI: 10.1109/TNB.2022.3228864
34. Ayala-Torres C, Hernández N, Galeano A, Novoa-Aponte L, Soto CY. Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells. *Ann Microbiol.* 2014;64:1189-1195. DOI: 10.1007/s13213-013-0758-y
35. Ferreyra Maillard APV, Espeche JC, Maturana P, Cutro AC, Hollmann A. Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2021;1863(6):183597. DOI: 10.1016/j.bbamem.2021.183597
36. Еремеев АВ, Пикина АС, Владимировна ТВ, Богомазова АН. Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых *in vitro* в 2D- и 3D-структурах. *Гены и клетки.* 2023;18(1):5-21. / Yereemeev AV, Pikina AS, Vladimirova TV, Bogomazova AN. Methods for assessing the viability of cells cultured *in vitro* in 2D and 3D structures. *Genes and Cells.* 2023;18(1):5-21. DOI: 10.23868/gc312198 (In Russian).
37. Wang M, Ateia M, Hatano Y, Miyanaga K, Yoshimura C. Novel fluorescence-based method for rapid quantification of live bacteria in river water and treated wastewater. *Env Sci Adv.* 2022;1(1):30-36. DOI: 10.1039/d1va00017a
38. Vriezen JA, de Bruijn FJ, Nüsslein KR. Desiccation induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express.* 2012 Jan 20;2(1):6. DOI: 10.1186/2191-0855-2-6

39. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;106:19-39. DOI: 10.1007/10_2007_073
40. Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods.* 2000 Sep;42(1):97-114. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00181-0
41. Müller S, Davey H. Recent advances in the analysis of individual microbial cells. *Cytometry.* 2009;75A:83-85. DOI: 10.1002/cyto.a.20702
42. Kramer B, Muranyi P. Effect of pulsed light on structural and physiological properties of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 2014;116(3):596-611. DOI: 10.1111/jam.12394
43. Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, Nie S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(1):40-46. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00282-3
44. Ali MM, Wolfe M, Tram K, Gu J, Filipe CDM, Li Y, et al. A DNAzyme-based colorimetric paper sensor for *Helicobacter pylori*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019;58:9907-9911. DOI: 10.1002/anie.201901873
45. Khoris IM, Chowdhury AD, Li TC, Suzuki T, Park EY. Advancement of capture immunoassay for real-time monitoring of hepatitis E virus-infected monkey. *Anal Chim Acta.* 2020;1110:64-71. DOI: 10.1016/j.aca.2020.02.020
46. Melike S, Novel A. Fast and Safe Method for *Francisella tularensis* detection with electrochemical sensor using graphene quantum dots as nanozymes. Available at SSRN. DOI: 10.2139/ssrn.4428705
47. Zhang XE, Cui Z, Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens Bioelectron.* 2016;15(76):243-250. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.069
48. Phillips GJ. Green fluorescent protein – a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;204(1):9-18. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10854.x
49. Lenz P, Bakkes PJ, Müller C, Malek M, Freudl R, Oldiges M, et al. Analysis of protein secretion in *Bacillus subtilis* by combining a secretion stress biosensor strain with an *in vivo* split GFP assay. *Microb Cell Fact.* 2023;22(1):203. DOI: 10.1186/s12934-023-02199-8
50. Valente C, Cruz AR, Henriques AO, Sá-Leão R. Intra-species interactions in *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;11:803286. DOI: 10.3389/fcimb.2021.803286
51. Zabalza-Baranguá A, San-Román B, Chacón-Díaz C, de Miguel MJ, Muñoz PM, Iriarte M, et al. GFP tagging of *Brucella melitensis* Rev1 allows the identification of vaccinated sheep. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(1):505-516. DOI: 10.1111/tbed.13053
52. Wendland M, Bumann D. Optimization of GFP levels for analyzing *Salmonella* gene expression during an infection. *FEBS Lett.* 2002;19;521(1-3):105-8. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02834-X
53. van Zyl WF, Deane SM, Dicks LM. Reporter systems for *in vivo* tracking of lactic acid bacteria in animal model studies. *Gut Microbes.* 2015;6(5):291-9. DOI: 10.1080/19490976.2015.1086058
54. Noah CW, Shaw CI, Ikeda JS, Kreuzer KS, Sofos JN. Development of green fluorescent protein-expressing bacterial strains and evaluation for potential use as positive controls in sample analyses. *J Food Prot.* 2005;68(4):680-686. DOI: 10.4315/0362-028X-68.4.680
55. Zhang XE, Cui Z, Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens Bioelectron.* 2016;15;76:243-50. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.069
56. Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:12501-12504.
57. Bar-Even A, Noor E, Flamholz A, Buescher JM, Milo R. Hydrophobicity and charge shape cellular metabolite concentrations. *PLoS Comput Biol.* 2011;7(10):e1002166. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002166
58. Шаров ТН, Викторов ДВ, Топорков АВ. Протеомный анализ в микробиологии. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2023;41(1):3-9. / Sharov TN, Viktorov DV, Toporkov AV. Proteomic analysis in microbiology. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2023;41(1):3-9. DOI: 10.17116/molgen2023410113 (In Russian).
59. Jain A, Singh HB, Das S. Deciphering plant-microbe crosstalk through proteomics studies. *Microbiol Res.* 2021;242:126590. DOI: 10.1016/j.micres.2020
60. Zhang Y, Lun CY, Tsui SK. Metagenomics: A new way to illustrate the crosstalk between infectious diseases and host microbiome. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26263-79. DOI: 10.3390/ijms161125957
61. Mahajan G, Mande SC. Using structural knowledge in the protein data bank to inform the search for potential host-microbe protein interactions in sequence space: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Bioinformatics.* 2017;18(1):201. DOI: 10.1186/s12859-017-1550-y
62. Devarajan AK, Truu M, Gopalasubramaniam SK, Muthukrishnan G, Truu J. Application of data integration for rice bacterial strain selection by combining their osmotic stress response and plant growth-promoting traits. *Front Microbiol.* 2022;15(13):1058772. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1058772
63. Šrajcar Gajdošik M, Andjelković U, Gašo-Sokač D, Pavlović H, Shevchuk O, Martinović T, et al. Proteomic analysis of food borne pathogens following the mode of action of the disinfectants based on pyridoxal oxime derivatives. *Food Res Int.* 2017;99(Pt 1):560-570. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.06.016
64. Chandrasekhar K, Sreedevi B, Sreevani S, Dileep A, Lebonah D, Seshapani P, et al. Characterisation and structural dynamics of differentially expressed proteins of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in response to *Cocos nucifera* Sap. *J Proteomics Bioinform.* 2014;7(7):179-185. DOI: 10.4172/0974-276X.1000318
65. Vranakis I, De Bock PJ, Papadioti A, Tselentis Y, Gevaert K, Tsiotis G, et al. Quantitative proteome profiling of *C. burnetii* under tetracycline stress conditions. *PLoS One.* 2012;7(3):e33599. DOI: 10.1371/journal.pone.0033599
66. Hemm MR, Paul BJ, Miranda-Ríos J, Zhang A, Soltanzad N, Storz G. Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *J Bacteriol.* 2010;192(1):46-58. DOI: 10.1128/JB.00872-09
67. Intelicato-Young J, Fox A. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2013;92(3):381-386. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.01.004
68. Schott AS, Behr J, Quinn J, Vogel RF. MALDI-TOF Mass spectrometry enables a comprehensive and fast analysis of dynamics and qualities of stress responses of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. *PLoS One.* 2016;26;11(10):e0165504. DOI: 10.1371/journal.pone.0165504
69. Tang J. Microbial metabolomics. *Curr Genomics.* 2011 Sep;12(6):391-403. DOI: 10.2174/138920211797248619
70. Chia JS, Lee YY, Huang PT, Chen JY. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. *Infect Immun.* 2001;69(4):2493-501. DOI: 10.1128/IAI.69.4.2493-2501.2001
71. Bonomo MG, Sico MA, Grieco S, Salzano G. Development and optimization of a fluorescent differential display PCR system for analyzing the stress response in *Lactobacillus sakei* strains. *Nutrients.* 2009;1(2):210-23. DOI: 10.3390/nu1020210
72. Feliciello I, Đermić E, Malović H, Ivanković S, Zahradka D, Ljubić S, et al. Regulation of *ssb* Gene Expression in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci.* 2022;18;23(18):10917. DOI: 10.3390/ijms231810917
73. Arunima A, Swain SK, Patra SD, Das S, Mohakud NK, Misra N, et al. Role of OB-fold protein Ydel in stress response and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Bacteriol.* 2020;7;203(1):e00237-20. DOI: 10.1128/JB.00237-20
74. Zhou Z, Chen J, Meng H, Dvornyk V, Gu JD. New PCR primers targeting hydrazine synthase and cytochrome c biogenesis proteins in anammox bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(3):1267-1287. DOI: 10.1007/s00253-016-8013-7

75. Chiang ELC, Lee S, Medriano CA, Li L, Bae S. Assessment of physiological responses of bacteria to chlorine and UV disinfection using a plate count method, flow cytometry and viability PCR. *J of Applied Microbiology*. 2022;132(3):1788-1801. DOI: 10.1111/jam.15325
76. Bae S, Wuertz SJA. Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(9):2940-2944. DOI: 10.1128/aem.01333-08
77. Cangelosi GA, Meschke JS. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(19):5884-5891. DOI: 10.1128/AEM.01763-14
78. Lee S, Bae S. Evaluating the newly developed dye, DyeTox13 Green C-2 Azide, and comparing it with existing EMA and PMA for the differentiation of viable and nonviable bacteria. *J Microbiol Methods*. 2018;148:33-39. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.03.018
79. Chiang ELC, Lee S, Medriano CA, Li L, Bae S. Assessment of physiological responses of bacteria to chlorine and UV disinfection using a plate count method, flow cytometry and viability PCR. *J Appl Microbiol*. 2022;132(3):1788-1801. DOI: 10.1111/jam.15325
80. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet*. 2015;16(2):85-97. DOI: 10.1038/nrg3868
81. Mironov KS, Sinetova MA, Shumskaya M, Los DA. Universal molecular triggers of stress responses in *Cyanobacterium synechocystis*. *Life (Basel)*. 2019;20;9(3):67. DOI: 10.3390/life9030067
82. Kim KS, Tiffany E, Lee JY, Oh A, Jin HS, Kim JS, et al. Genome-wide multi-omics analysis reveals the nutrient-dependent metabolic features of mucin-degrading gut bacteria. *Gut Microbes*. 2023;15(1):2221811. DOI: 10.1080/19490976.2023.2221811
83. Leshchiner D, Rosconi F, Sundaresh B, Rudmann E, Ramirez LMN, Nishimoto AT, et al. A genome-wide atlas of antibiotic susceptibility targets and pathways to tolerance. *Nat Commun*. 2022;7;13(1):3165. DOI: 10.1038/s41467-022-30967-4

Информация о соавторах:

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Салихов Руслан Римович, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Oksana A. Volokh, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

Lyubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Sciences), head of the scientific department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Ruslan R. Salikhov, Junior Researcher of the Laboratory of Cholera Vaccines of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor



Медицинские изделия для лабораторной диагностики



Питательные среды

Диагностикумы

Сыворотки

ИФА-диагностика

Наборы для
ПЦР-диагностики

Определение
чувствительности к АМП

По вопросам приобретения продукции

ООО «Русбиофарм»
12530, Москва, Старопетровский пр., 11, корп.1
8 (800) 707-17-50
mail@rbpharm.ru
www.rbpharm.ru

Молекулярно-генетические особенности *Klebsiella pneumoniae* и продукция микроцинов

М.А.Евсеева¹, В.А.Авдеева¹, И.А.Ларионова², Л.В.Коломбет¹, О.Е.Хохлова¹

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

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация

Klebsiella pneumoniae – грамотрицательные бактерии, которые могут как бессимптомно колонизировать слизистые оболочки человека, в частности кишечного тракта, так и являться причиной развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Популяция бактерий *K. pneumoniae* характеризуется генетическим разнообразием, выделяют классические (сКр) и гипервирулентные (hvКр) штаммы *K. pneumoniae*, а также варианты с сочетанием свойств классических и гипервирулентных штаммов. Представители вида *K. pneumoniae* постоянно эволюционируют, приобретая новые детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности. Это бросает вызов мировому научному и медицинскому сообществам для решения проблемы поиска и разработки новых средств и препаратов для лечения инфекций, вызванных данным видом микроорганизмов. Штаммы *K. pneumoniae* продуцируют несколько видов антимикробных пептидов, известных как бактериоцины, которые обладают антибактериальной активностью в отношении близкородственных видов. Изучение бактериоцинов и, в частности, их низкомолекулярных вариантов – микроцинов – создает основу для их потенциального практического использования, в т.ч. для лечения инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, гипервирулентные штаммы, антибиотикорезистентность, молекулярно-генетические особенности, микроцины

Для цитирования: Евсеева М.А., Авдеева В.А., Ларионова И.А., Коломбет Л.В., Хохлова О.Е. Молекулярно-генетические особенности *Klebsiella pneumoniae* и продукция микроцинов. Бактериология. 2024; 9(2): 58–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-58-66

Molecular genetic features of *Klebsiella pneumoniae* and production of microcins

М.А.Евсеева¹, В.А.Авдеева¹, И.А.Ларионова², Л.В.Коломбет¹, О.Е.Хохлова¹

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

²V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russian Federation

Klebsiella pneumoniae strains are Gram-negative commensal bacteria that asymptotically colonize human mucous membranes, such as the intestinal tract, but are a leading cause of healthcare-associated infections. Strains of *K. pneumoniae* are characterized by genetic diversity; classic *K. pneumoniae* (сКр), hypervirulent *K. pneumoniae* (hvКр) and a combination of both are distinguished. *K. pneumoniae* strains are constantly evolving in virulence and antibiotic resistance, challenging available drugs to treat such infections. Strains of *K. pneumoniae* produce several types of antimicrobial peptides known as bacteriocins, which have antibacterial activity against closely related species, which may provide the basis for research into the potential use of bacteriocins, namely microcins, for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, hypervirulent strains, antibiotic resistance, molecular genetic features, microcins

For citation: Evseeva M.A., Avdeeva V.A., Larionova I.A., Colombet L.V., Khokhlova O.E. Molecular genetic features of *Klebsiella pneumoniae* and production of microcins. Bacteriology. 2024; 9(2): 58–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-58-66

Для корреспонденции:

Евсеева Мария Александровна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24

Статья поступила 12.04.2024, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Mariya A. Evseeva, Junior Researcher, Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребnadzo

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation

The article was received 12.04.2024, accepted for publication 28.06.2024

Вид *Klebsiella pneumoniae* является широко распространенным в природе и в условиях госпитальной среды представителем семейства *Enterobacteriaceae*. Бактерии данного вида встречаются в поверхностных водах, на растениях, в почве, а также колонизируют слизистые оболочки толстого кишечника, урогенитальный тракт и др. [1]. Среди клинических штаммов выделяют два основных патотипа: классические (сКр) и гипервирулентные (hvКр) *K. pneumoniae* [2].

В Российской Федерации, как и во всем мире, резистентные к антимикробным препаратам штаммы *K. pneumoniae* являются актуальными госпитальными патогенами и вызывают широкий спектр инфекционных осложнений: инфекции кровотока, респираторного тракта, мочевыводящих путей, центральной нервной системы (ЦНС), желудочно-кишечного тракта, глаз, кожные инфекции, первичные абсцессы печени и др. [3, 4]. *K. pneumoniae* входит в группу ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), объединяющую нозокомиальные патогены с высоким уровнем резистентности к различным антибиотикам [5]. Глобальное распространение гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью (multidrug-resistant/MDR), а также с экстремальной антибиотикоустойчивостью стало признанной угрозой для систем здравоохранения во всем мире [6].

До недавнего времени клинические штаммы *K. pneumoniae* проявляли либо фенотип MDR, либо фенотип гипервирулентности. Однако в настоящее время причиной инфекционных осложнений все чаще становятся конвергентные клоны – MDR-hvКр, которые одновременно являются высокопатогенными и устойчивыми к большинству доступных антибиотиков. В основе формирования таких клонов с фенотипом MDR-hvКр лежат три основных плазмид-ассоциированных механизма: приобретение сКр с фенотипом MDR плазмид с детерминантами гипервирулентности; приобретение hvКр плазмид с детерминантами MDR; приобретение штаммами *K. pneumoniae* гибридных плазмид, несущих детерминанты как вирулентности, так и MDR [7].

Штаммы *K. pneumoniae* продуцируют широкий спектр веществ, необходимых для их конкурентного преимущества, ярким примером которых являются бактериоцины, включающие пептиды с низкой молекулярной массой (<10 кДа), называемые микроцинами [8].

В настоящем обзоре представлен анализ данных литературы о молекулярно-генетических особенностях клинических штаммов *K. pneumoniae*, а также о возможности продукции данными штаммами микроцинов.

Эпидемиология клинических штаммов *K. pneumoniae*. Распространение основных клонов и линий в мире и России

У здоровых людей из западных стран частота колонизации слизистой оболочки толстой кишки штаммами сКр варьировала от 5 до 35% [9]. В азиатских странах уровень колонизации *K. pneumoniae* у здоровых взрослых людей составил 87,7; 61,1; 75; 58,8; 57,9; 18,8; 52,9 и 41,3% в Малайзии, Сингапуре, Тайване, Гонконге, Китае, Японии, Таиланде и Вьетнаме соответственно [10]. Получение точных данных о степени колонизации слизистой оболочки кишечника штам-

мами hvКр осложнено тем, что специфические для данных штаммов маркеры не всегда определяли в исследованиях, в отличие от маркеров, ассоциированных с сКр. Однако в ряде работ отмечено, что колонизация толстой кишки штаммами hvКр у здоровых корейцев составила 4,6% (на основании выявления бактерий *K. pneumoniae*, относящихся к капсульному типу K1) [11]. У здоровых лиц из Малайзии, Сингапура, Тайваня, Гонконга, Китая, Японии, Таиланда и Вьетнама штаммы hvКр, относящиеся к капсульным типам K1 и K2, были выявлены в 14,1; 14,9; 11,3; 12; 11,7; 16,7; 2,7 и 0% случаев соответственно [11].

Одним из инструментов субвидового молекулярно-генетического типирования штаммов *K. pneumoniae* является метод MLST-типирования (multilocus sequence typing – мультилокусное секвенирование-типирование) по семи генам «домашнего хозяйства». Сравнивая аллельные варианты таких генов, можно структурировать популяцию штаммов *K. pneumoniae* в генетические линии, которые связаны с конкретными сиквенс-типами (ST) [7]. Множественно-резистентные к антимикробным препаратам штаммы *K. pneumoniae* являются представителями определенных клональных комплексов (CC), или групп, объединяющих генетически близкие штаммы, таких как CC258, включающих сиквенс-типы ST258, ST11, ST512, ST340, ST437 и др., а также CC15 и CC14. Кроме того, по всему миру широко распространены ассоциированные с внутрибольничными вспышками сиквенс-типы *K. pneumoniae* ST15, ST101, ST147 и ST307 [12, 13]. Штаммы hvКр, относящиеся к капсульному типу K1, в основном принадлежат к ST23, а hvКр, относящиеся к капсульному типу K2, – к ST86, ST65, ST25 [14].

Штаммы *K. pneumoniae*, в т.ч. hvКр, как и другие представители грамотрицательных бактерий, имеют дополнительную наружную мембрану, состоящую из липидного бислоя со связанными с ним белками, липопroteинами и липополисахаридом. Капсульный полисахарид окружает бактериальную клетку, выполняя различные функции. Среди hvКр наиболее распространенными являются штаммы, относящиеся к капсульным типам K1, K2, K5, K20, K54 и K57, при этом ~70% всех выделенных изолятов hvКр являются представителями K1- и K2-типов [16]. Однако тенденция приобретения штаммами сКр плазмид с детерминантами, определяющими формирование фенотипа гипервирулентности, отмечена также и для штаммов, относящихся к другим капсульным типам, например, к K47 и K64 [15].

Множественно-резистентные гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* относятся к различным сиквенс-типам, среди которых наиболее распространенными являются ST11, объединяющий KPC-продуцирующие карбапенем-резистентные штаммы, а также доминирующая линия hvКр ST23 [14]. Кроме того, установлены региональные различия в распространении различных ST. Так, в Китае преобладают два генетических варианта hvКр, по результатам различных исследований доля hvКр, относящихся к ST23, составила 69,6%, доля hvКр MDR, относящихся к ST11, – 77,3% [16]. В последние годы в Европе и Америке, за исключением Индии и Бразилии, среди hvКр преобладают генетические варианты ST23, ST25 и ST86 [16].

На сегодняшний день отмечено появление новой международной клональной линии высокого риска – ST395, ассо-

цированной с MDR. Данная линия объединяет штаммы, продуцирующие β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемазы [17]. Согласно данным MLST-типирования, ST395 отличается от ST11 (относится к CC258) по трем из семи анализируемых локусов и, следовательно, не принадлежит к CC258. Однако анализ данных полногеномного секвенирования показал, что ST395 эволюционировал из ST11 посредством генетической рекомбинации и приобретения больших геномных областей от представителей других ST [18]. ST395 впервые был выявлен во Франции в 2010 г., во время нозокомиальной вспышки, вызванной штаммами *K. pneumoniae*, продуцирующими карбапенемазу OXA-48. Штаммы, относящиеся к ST39, несущие плазмиды с генами *bla_{OXA-48}*, широко распространены в мире и обнаружены во многих странах Европы (Чехия, Дания, Франция, Германия, Венгрия, Ирландия, Италия, Румыния, Россия, Швеция, Великобритания), Северной Африки (Египет, Алжир), Юго-Восточной Азии (Малайзия) и Ближнего Востока (Израиль, Кувейт) [13]. Помимо OXA-48, изоляты этого генотипа продуцируют различные карбапенемазы, такие как KPC-2 (штаммы, выделенные в Китае), KPC-3 (в Италии), NDM-1 (в России), а также NDM-1 и NDM-5 (в Германии) [13, 19].

Вирулентность *K. pneumoniae*, генетические детерминанты. Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae*

До определенного времени штаммы сКр являлись основной причиной развития пневмоний у лиц, страдающих алкоголизмом и диабетом, а также входили в число значимых уропатогенов и патогенов, вызывающих инфекционные заболевания желчевыводящих путей. Кроме того, данные штаммы вызывали такие инфекционные осложнения, как остеомиелиты и инфекции кровотока. В последние десятилетия лечение инфекций, вызванных штаммами сКр, крайне осложнено благодаря их способности аккумулировать детерминанты, ассоциированные с формированием резистентности к антибактериальным препаратам [20]. Наибольшую клиническую значимость приобрели штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазу NDM и обладающие также резистентностью к фторхинолонам, аминогликозидам и другим антимикробным препаратам.

Варианты hvКр появились в 1980-х гг. и получили распространение в условиях как госпитальной, так и негоспитальной среды. Клебсиеллы этого патотипа характеризуются наличием более широкого спектра вирулентных свойств по сравнению с сКр. Несмотря на изучение вопросов, связанных с эпидемиологией штаммов hvКр, на сегодняшний день до сих пор не установлен первичный источник возникновения этих штаммов, а также не выяснены механизмы их распространения из Азиатско-Тихоокеанского региона, где они впервые были обнаружены. Так, штаммы данного патотипа были выделены в США, Канаде, Европе, Израиле, Южной Африке, Австралии и других регионах [21]. Повышенное внимание клиницистов к hvКр обусловлено тем, что данные штаммы могут вызывать такие опасные формы инфекций, как эндофтальмит и инфекции ЦНС с уровнем смертности до 42% и более [20].

Основными клинически значимыми признаками, отличающими штаммы hvКр от сКр, являются их способность вы-

зывать такие инфекционные осложнения, как внебольничные гнойные абсцессы печени у пациентов, не имевших в анамнезе заболеваний печени и желчного пузыря, а также возможность генерализации инфекции с вовлечением в инфекционный процесс в 11–80% случаев других органов и тканей (легкие, плевра, простата, кости, суставы, почки, селезенка, мышцы/фасции, мягкие ткани, кожа, глаза и ЦНС) [21].

Капсула, окружающая бактериальные клетки, является важным фактором вирулентности для штаммов сКр [22]. Однако важнейшей особенностью, ассоциированной с фенотипом гипервирулентности, является способность штаммов hvКр к гиперпродукции капсульного полисахарида. Это опосредовано, по крайней мере частично, экспрессией специфических для hvКр генов *rtmpA* и/или *rtmpA2*, расположенных на плазмиде вирулентности pLVPK, а также генов *rcsB* и *wzy-K1 (magA)*, локализованных в хромосоме [18]. Утрата или инактивация *rtmpA* и/или *rtmpA2* приводит к снижению интенсивности продукции капсульных полисахаридов, и, как следствие, к снижению уровня вирулентности. Продукция и разнообразие структур капсульных полисахаридов определяются хромосомным опероном *cps*, который несет в себе гены *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB*, *cpsG* и *galF* [23]. Секвенирование *wzi* и *wzc* позволяет определять варианты капсульных типов *K. pneumoniae* [24]. В исследованиях, направленных на изучение штаммов hvКр, было показано, что капсульный полисахарид защищает микроорганизм от фагоцитоза и бактерицидной активности, опосредованной дефенсином человека, маскирует бактериальные липополисахариды от взаимодействия с антителами и препятствует активации С3b-компонента комплимента [25].

Штаммы hvКр обладают разной способностью продуцировать четыре различных сидерофора: энтеробактин, сальмохелин, иерсинибактин и азробактин. Азробактин кодируется опероном *iucABCD*, а его родственник рецептор – геном *iutA*. Во многих работах отмечено, что системы *iucABCD-iutA* встречаются в штаммах hvКр чаще, чем в штаммах сКр. Исследование, проведенное в Тайване, показало, что гены, ассоциированные с продукцией азробактина, выявлены в 100% случаев в геномах представителей капсульных типов K1 и K2 и в 86% случаев в изолятах, не относящихся к K1/K2-типам [16]. Молекулярно-эпидемиологические исследования показали, что штаммы hvКр также чаще продуцируют сальмохелин, иерсинибактин и азробактин, чем штаммы сКр. При этом продукция иерсиниабактина характерна как для штаммов hvКр, так и для сКр, тогда как сальмохелин и азробактин продуцируют только hvКр. Количественные анализы продукции сидерофоров продемонстрировали, что штаммы hvКр производят больше сидерофоров, чем штаммы сКр [26].

Примечательно, что большая плаزمида вирулентности pLVPK была обнаружена во всех клональных линиях hvКр. Эта плазмида кодирует азробактин, сальмохелин и RtmpA (регулятор гипермукоидного фенотипа), продукция которых характерна исключительно для изолятов hvКр. Было обнаружено, что утрата данной плазмиды значительно снижает вирулентность штаммов *K. pneumoniae*, что указывает на важную роль pLVPK в формировании фенотипа гипервирулентности [17]. Кроме того, сравнение полногеномных по-

следовательностей штаммов *K. pneumoniae* выявило отдельный вариант острова патогенности КРНР1208, ассоциированного с СС23. Большинство изолятов, входящих в данный клональный комплекс содержат в острове патогенности КРНР1208 гены, кодирующие иерсиниабактин, колибактин и микроцин Е492 [27].

В исследовании, проведенном в Тайване, описан штамм сКр, относящийся к ST11, который содержал гибридную плазмиду вирулентности hvKp pVir (297 984 п.н.) [28]. Выявлено, что примерно 38% последовательности pVir на 99% гомологична с 49 и 47% последовательностей плазмид pK2044 и pLVPK соответственно; оставшаяся часть pVir на 99% гомологична 61% последовательности плазмиды устойчивости pMK-NDM, присутствующей в штамме *K. pneumoniae*, продуцирующем NDM. Интересно, что, несмотря на присутствие в плазмиде pVir генов *iroBCDN*, *iucABCD iutA*, *rmpA* и *rmpA2*, штамм, несущий данную плазмиду, не проявлял фенотипических признаков гипервирулентности на модели системной инфекции мышей. Это позволяет предположить, что отсутствующие в гибридной плазмиде pVir части плазмид pK2044 и pLVPK содержат значимые детерминанты вирулентности, механизм действия которых не до конца изучен. Также в геномах таких штаммов обнаружен интегративный конъюгативный генетический элемент (ICE) размером 76 т.п.н. (ICEKp). Помимо участка, гомологичного острову высокой патогенности иерсиний, содержащего гены биосинтеза иерсиниабактина, еще один участок был гомологичен плазмиде вирулентности pK2044 и содержал последовательности генов, кодирующих синтез сидерофора сальмохелина (*iro*) и RmpAб и в ряде случаев оперон микроцина Е492 [2].

В ходе экспериментов, проведенных с использованием мышиной модели клебсиеллезной инфекции, установлено, что в процессе колонизации штаммами сКр слизистых оболочек важную роль играют такие клеточные структуры и факторы, как капсульный полисахарид, липополисахарид, жирные кислоты и фосфолипиды, белок внешней мембраны, белки фолдинга, элонгационный фактор белкового синтеза, регулятор аэробного-анаэробного метаболизма, высокомолекулярные белки адгезии, О-сиалогликопротеиновая эндопептидаза, фермент метаболизма лактозы, циклогексадиенил-дегидратаза, α-глюкан-фосфорилаза, система секреции III типа, ДНК-праймаза, аденин-специфичная метилаза, регуляторы метаболизма азота и др. [29].

У бактерий *K. pneumoniae* обнаружены фимбрии I, III и VI типов. Наибольшее значение в колонизации имеют фимбрии I и III типов, обеспечивающие адгезию к клеткам специфических тканей в пораженном организме, а также к абиотическим поверхностям (например, катетерам). У изолятов *K. pneumoniae* адгезия преимущественно обеспечивается фимбриальными адгезинами типов I и III, но анализ геномов показывает, что они имеют и другие варианты фимбрий. Установлено, что наличие фимбрий I типа, кодируемых геном *fimH*, ассоциировано со штаммами *K. pneumoniae*, вызывающими инфекции мочевыводящих путей [27]. Фимбрии III типа обеспечивают прикрепление бактерий к поверхности эпителия трахеи и к компонентам базальной мембраны мочевыводящих путей, а также играют роль в образовании биопленок. Так, среди клебсиелл, выделенных при циститах,

не менее 80–90% штаммов обладают фимбриями этого типа, а при пиелонефритах – 60–70% штаммов [29].

Для микроорганизмов предпочтительными источниками азота обычно являются определенные азотистые соединения, но, когда эти основные источники отсутствуют или находятся в недостаточной концентрации, могут быть использованы и другие источники азота, такие как пурины, белки или аллантаин. Показано, что штаммы *K. pneumoniae* способны использовать аллантаин в качестве источника углерода, азота и энергии, как в аэробных, так и в анаэробных условиях. За утилизацию аллантаина отвечает хромосомный регион размером 22 т.п.н., включающий в себя 13 генов. Аллантаиновый регулон состоит из трех структурных оперонов, экспрессирующихся с промоторов *allAp*, *gclp* и *allDp*, и двух регуляторов, кодируемых генами *allR* и *allS*. Ген *allR* является репрессором регулона, в то время как ген *allS* – активатором, который взаимодействует только с *allDp* [30].

У штаммов *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* выявлены энтеротоксины LT и ST. Активность энтеротоксинов ST реализуется через активацию гуанилатциклазной системы с последующим выходом из клетки ионов и макромолекул. Энтеротоксины LT кодируются хромосомными генами, они проявляют цитотоксичность в отношении клеток разных типов, вызывая приток жидкости в подслизистую оболочку кишечника [31].

Клебсиеллы продуцируют широкий спектр экзоферментов, проявляющих цитотоксическую активность в отношении различных клеток за счет разрушения РНК, ДНК, гиалуроновой и нейраминовой кислот [31].

Таким образом, в современной научной литературе к основным факторам вирулентности разных штаммов *K. pneumoniae* относят достаточно широкий круг признаков, детерминированных генами, локализованными в хромосоме и на плаزمиде.

Клиническое значение штаммов *K. pneumoniae*

Клебсиеллы вызывают широкий спектр заболеваний у человека. Основные клинические формы – инфекции кровотока, поражения респираторного тракта, инфекции мочевыводящих путей, инфекции ЦНС, поражения желудочно-кишечного тракта. Инфекции кровотока, вызванные *K. pneumoniae*, наиболее характерны для детей, лиц пожилого возраста и пациентов с ослабленной иммунной системой, а также пациентов, которым проводили инвазивные процедуры – катетеризацию кровеносных сосудов, цистоскопию, хирургические вмешательства или назначали нерациональную антибиотикотерапию. Такие инфекции кровотока часто носят характер моноинфекций, летальность при этом достигает 50–60% [26].

Поражения респираторного тракта, вызываемые *K. pneumoniae*, достаточно разнообразны в зависимости от подвида возбудителя. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* – один из основных возбудителей воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (бронхитов и бронхопневмоний), как госпитальных, так и внебольничных. Инфекции нижних дыхательных путей (пневмонии) часто развиваются у лиц с хроническими поражениями респираторного тракта либо на фоне общего ослабления организма. Показано, что у лиц пожилого возраста (61–88 лет) штам-

мы *K. pneumoniae* вызывает воспаление легких достаточно часто – в 42% случаев. *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* известна как возбудитель хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, например хронического атрофического ринита с поражением подлежащих костей и образованием корок, который может распространяться на глотку, гортань и трахею и приводить к потере обоняния. Описаны случаи инфекций кровотока, вызванных *K. ozaenae*, у лиц пожилого возраста или ослабленных пациентов, например после пересадки почки. Также описан уникальный случай, когда *K. ozaenae* явилась причиной тяжелого сепсиса у молодого практически здорового человека. *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* выступает возбудителем риносклеромы – хронического заболевания дыхательных путей, характеризующегося их обструкцией вследствие прогрессирующего кислородного голодания и инфекционной интоксикации [32].

Инфекции мочевыводящих путей, вызываемые *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (14–20% от общего количества), чаще носят госпитальный характер, обычно связаны с катетеризацией мочевых путей, их клиника варьирует от бессимптомной бактериурии до циститов, пиелонефритов и абсцессов почек.

Инфекции ЦНС, вызываемые *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, наблюдаются сравнительно редко, чаще у детей младшего возраста и мужчин после операций на ЦНС, гемодиализа или на фоне цирроза печени, сахарного диабета, онкологических и гематологических заболеваний, иммунодефицита и др.; ~30% этих инфекций носят госпитальный характер [31].

Некротические энтероколиты – одно из наиболее серьезных желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных детей, особенно родившихся с недостаточным весом или недоношенных. Данное заболевание описано как в виде спорадических случаев, так и в виде вспышек. Уровень смертности составляет 6% (с разбросом от 0 до 88%) [33].

Описанные в ряде случаев поражения кожи, вызванные клебсиеллами, связаны с определенными локальными факторами, иммунодефицитом пациента и повышенной способностью к адгезии и вирулентностью возбудителя [31].

Эндогенные эндофтальмиты – достаточно редкий инфекционный процесс, который может приводить к вторичной диссеминации патогена во внутриглазную полость из очага, находящегося вне глаза. *K. pneumoniae* является возбудителем данного заболевания в Азии в 10–15 раз чаще, чем другие патогены. Установлено, что эндогенные эндофтальмиты чаще всего вызывают клебсиеллы типов K1 и K2 [31].

Абсцессы печени – инвазивный инфекционный процесс, вызываемый *hV*Kp, описанный как эмерджентное заболевание в странах Азии, а затем регистрируемый по всему миру. Данный процесс характеризуется тем, что возбудитель может быстро диссеминировать по организму и вызвать дополнительные инфекционные осложнения, такие как септический тромбофлебит и др. Для выживания пациентов с этим инвазивным синдромом очень важны быстрая постановка диагноза и выбор адекватной антибиотикотерапии в сочетании с хирургическим вмешательством [31].

Клебсиеллы могут вызвать у ослабленных лиц такие вторичные инфекции, как эндокардит, васкулит, острый

холецистит, абсцесс средостения, перитонит, мионекроз, остеомиелит, ретрофарингеальный абсцесс, отит, периодонтит и др. [31].

Резистентность *K. pneumoniae* к антимикробным химиопрепаратам, генетические детерминанты

Главным механизмом резистентности штаммов *K. pneumoniae* к антибактериальным химиопрепаратам является продукция БЛРС. Среди нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в России в 2015–2016 гг., 75,6% изолятов были продуцентами БЛРС, 90,2% изолятов – устойчивы к цефотаксиму, 51,2% – к фосфомицину, 26,5% – к карбапенемам, 9,4% – к колистину [34]. У штаммов *K. pneumoniae* выявлены БЛРС класса А (SHV, TEM, CTX-M, PER, KPS, GES), класса В (IMP, VIM, NDM, GIM, SIM), класса С (CMY, FOX, MOX, DHA) и класса D (OXA) [35]. Устойчивость к β-лактамам антибиотикам может быть также связана с модификацией пенициллинсвязывающих белков, активацией эффлюкс-насосов (AcrAB-ToiC, KpnGH, KpnEF), а также изменением поринов (OmpK35, OmpK36, LamB, PhoE, KpnO), обеспечивающих транспорт β-лактамов внутрь бактериальной клетки [36]. Резистентность к фторхинолонам может быть связана с мутациями в генах, кодирующих ДНК-гиразу (*gyrA*), топоизомеразу IV (*parC*); с потерей порина OmpK35; инактивацией фторхинолонов аминогликозид-ацетилтрансферазой AAC(6′)-Ib; с белками, экранирующими мишени фторхинолонов (*qnr*), гены которых локализованы на плазмидах; гиперфункцией эффлюкс-насосов AcrAB-ToiC, KmrA, KpnGH, эффлюкс-насосов цитоплазматической мембраны (гены *oxqAB* и *qepA*) и др. [36]. Резистентность к аминогликозидам связана с инактивацией аминогликозидов аминогликозид-ацетилтрансферазой AAC(6′)-Ib и аминогликозид-фосфотрансферазой (APH); метилированием 16S рРНК метилтрансферазами, включая метилтрансферазы ArgA, RmtB, RmtC и др.; мутациями в гене *rrs*, кодирующем 16S РНК; гиперфункцией эффлюкс-насоса AcrAD и др. [37, 38]. Резистентность к колистину связана с мутациями в гене *mgrB*, ответственном за регуляцию синтеза липополисахарида; наличием плазмидных генов *mcr* типа, кодирующих фосфатидилэтаноламинотрансферазу и др. [35, 39].

Штаммы *hV*Kp в первые несколько десятилетий после их выявления характеризовались чувствительностью ко многим антибиотикам. Так, уровень распространенности штаммов, продуцирующих БЛРС среди *hV*Kp, вызывающих бактериомию, составлял <5%, при этом уровень штаммов, устойчивых дополнительно к любому другому антибиотику, составлял ≤2% [40]. Однако спустя почти четыре десятилетия появились устойчивые к антибиотикам изоляты *hV*Kp, представляющие большую клиническую значимость. В исследовании 2016 г., проведенном в Китае, отмечено, что 57% штаммов *hV*Kp, вызывающих инфекции кровотока, продуцировали карбапенемазы [41]. При этом наблюдались два типа конвергенции: приобретение изолятами *sKp* генов или целых плазмид вирулентности и приобретение изолятами *hV*Kp генов устойчивости к антибиотикам, хромосомной или плазмидной локализации. Среди клинических штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых к карбапенемам, доля *hV*Kp была близка к 10% [42]. Это связано с тем, что гены, кодирующие вирулентность и устойчивость к антибиотикам, часто распо-

лагаются на мобильных генетических элементах, таких как плазмиды и интегративные конъюгативные элементы [43].

Исследования штаммов *K. pneumoniae*, проводимые мировым научным сообществом, позволили выявить гены устойчивости к противомикробным препаратам во многих изолятах, относящихся к ST43 и K2-типу, а также ST23 и K1-типу и др. Обнаружены штаммы, несущие две и более плазмид, которые представляли собой большие гибридные плазмиды вирулентности и антибиотикоустойчивости и несли гены резистентности к карбапенемам *bla*_{KPC-2} и др. [44]. Например, штамм hvKp с множественной лекарственной устойчивостью, выделенный в Китае, относится к ST23 и K1-типу, имеет большинство генов вирулентности hvKp, но также содержит гибридную плазмиду вирулентности/резистентности к антибиотикам, которая кодирует сальмохелин, *rmpA/rmpA2* и *bla*_{CTX-M-24}. В хромосоме данного штамма выявлены дополнительные гены устойчивости к антибиотикам: *bla*_{SHV-36}, *oqxA/oqxB* и *fosA* [45].

В Российской Федерации карбапенемрезистентные штаммы *K. pneumoniae* hvKp выявлены среди генетических линий сиквенса-типов ST15, ST147, ST395 и ST874. Например, были описаны штаммы *K. pneumoniae*, выделенные от нейрохирургических больных, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии г. Москвы, которые одновременно несли три гена карбапенемаз – *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} и *bla*_{OXA-48}, а также ген цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15} и два интегрона класса 1 [46]. Описаны близкородственные штаммы *K. pneumoniae* ST39, капсульного типа K23, выделенные от нейрохирургических больных, несущих одновременно три крупные плазмиды групп IncHI1B, IncC и IncFIB, имеющих в своем составе гены карбапенемаз трех типов: *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} и *bla*_{KPC-2} соответственно. Первая из них представляла собой гибридную плазмиду, объединяющую два участка генов устойчивости (*bla*_{OXA-48} и *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *catB*, *qnrS1*, *int1*) и участок генов вирулентности (*iucABCD*, *iutA*, *terC* и *rmpA2::IS110*) и обладала высокой степенью гомологии для всех изученных в работе штаммов [47].

Микроцины, продуцируемые штаммами *K. pneumoniae*

Микроцины представляют собой не-SOS-индуцируемые низкомолекулярные (<10 кДа) пептиды, участвующие в конкурентных взаимодействиях между представителями семейства *Enterobacteriaceae* в кишечной микрофлоре [48]. Сообщалось, что они регулируют микробные сообщества, влияя на бактериальные взаимодействия внутри микробных экосистем. Их разделяют на две категории в зависимости от молекулярной массы, наличия дисульфидных связей и посттрансляционных модификаций [49].

Микроцины класса I представляют собой посттрансляционно модифицированные пептиды с низкой молекулярной массой (<5 кДа), такие как микроцины B17, C7/C51 и J25, продуцируемые *Escherichia coli*; микроцины класса II представляют собой более крупные пептиды (от 5 до 10 кДа) [50]. Класс II делится на два подкласса: подкласс IIa, объединяющий микроцины, некоторые из которых имеют дисульфидные связи, но не имеют дальнейших посттрансляционных модификаций, и подкласс IIb, представители которого являются линейными пептидами с посттрансляционными модификациями на C-конце. Пептиды подкласса IIa включают микроцины MccL, MccV и Mcc24, продуцируемые *E. coli*, а

подкласса IIb – микроцин MccE492, продуцируемый *K. pneumoniae*, и микроцины MccM и MccH47, продуцируемые *E. coli*. Механизмы их действия связаны с образованием пор, нуклеазной активностью (ДНКазы и РНКазы) и ингибированием синтеза белка или репликации ДНК [48].

Установлено, что 32,8% штаммов *K. pneumoniae* продуцируют по крайней мере один тип бактериоцина. У разных генетических вариантов отмечена продукция различных типов бактериоцинов; при этом у представителей некоторых ST бактериоцины не обнаружены. В геномах штаммов *K. pneumoniae* наиболее часто закодирован микроцин E492 (14,4%), который выявлен преимущественно у изолятов ST23. Штаммы *K. pneumoniae* – продуценты микроцина E492 проявляли промежуточную активность в отношении штаммов рода *Klebsiella*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter bayly*, *Stenotropomonas maltophilia* и др. Кроме того, они также имели активность против *Streptococcus mutans*. Клоацин-подобный бактериоцин обнаружен у 7,2% штаммов *K. pneumoniae*, причем все они были изолятами, не относящимися к ST23, и проявляли ингибирующую активность в отношении близкородственных видов, главным образом *Klebsiella* spp. Клебицин B-подобный бактериоцин обнаружен в 9,4% случаев. Другие бактериоцины, такие как микроцин S-подобный, микроцин B17 и клебицин C-подобный, были выявлены с более низкой частотой и имели ограниченную ингибирующую активность [50].

Оперон микроцина E492 размером ~13 т.п.н. объединяет не менее 10 генов, в т.ч. гены, роль которых в синтезе данного микроцина не установлена. Фрагмент хромосомной ДНК *K. pneumoniae* штамма RYC492, ответственный за продукцию микроцина E492 и иммунитет к нему, был клонирован, кластер генов охарактеризован [51]. Сравнение аминокислотных последовательностей микроцина E492, полученных из очищенного пептида или из последовательности гена методом обратной транскрипции, позволило выявить молекулу-предшественника, состоящую из 103 аминокислотных остатков, которая в дальнейшем расщепляется на гидрофобную часть и зрелый пептид из 84 анионных остатков с молекулярной массой 7886 Да. Микроцин E492 способен образовывать ионные каналы в плоских бислоях бактериальной мембраны, что, однако, не вызывает значительного увеличения ее проницаемости [52]. Предшественник микроцина подвергается посттрансляционной модификации, в процессе гликозилирования C-концевой серин связывается с линейным тримером N-2,3-(дигидроксибензоил)-L-серина, который представляет собой сидерофор катехола. Данные молекулы связываются с железом и импортируют его в клетки через высокоаффинные рецепторы. Комплекс сидерофор-микроцин связывает трехвалентное железо через катехолатный рецептор и выступает как сидерофор. Микроцин E492 распознает FerA, Fiu и/или Cir как рецепторы внешней мембраны, при этом основным рецептором является FerA. Комплекс белков внутренней мембраны TonB-ExbB-ExbD через движущую силу протонов мембраны передает энергию внешней мембране, что приводит к попаданию микроцина внутрь. В периплазматическом пространстве микроцин E492 взаимодействует с белками внутренней мембраны ManY/ManZ, маннозной пермеазы, что индуцирует пороо-

бразование, а также деполяризацию внутренней мембраны, опосредованную TopB, вызывая гибель бактериальных клеток [50]. В дальнейшем предстоит выяснить, имеет ли микроцин другие мишени в цитоплазме клетки.

Заключение

Широкое распространение гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* (hvKp), обладающих детерминантами множественной лекарственной устойчивости, – серьезная причина для беспокойства ученых и медицинских работников во всем мире. Важнейшим клинически значимым признаком данных штаммов, который должен учитываться при эпидемиологическом надзоре, лечении, а также при разработке диагностических тест-систем и новых антимикробных препаратов, является сочетание фенотипов вирулентности и устойчивости к противомикробным препаратам. Бактериоцины – вещества, продуцируемые бактериями, в т.ч. *K. pneumoniae*, которые обладают антибактериальной активностью. Изучение бактериоцинов, а именно микроцинов, создает основу для их потенциального применения в качестве препаратов для лечения инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2014;9(9):1071-81. DOI: 10.2217/fmb.14.48
- Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev.* 2019 May 15;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
- Starkova P, Lazareva I, Avdeeva A, Sulian O, Likholetova D, Ageevets V, et al. Emergence of Hybrid Resistance and Virulence Plasmids Harboring New Delhi Metallo- β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics (Basel).* 2021 Jun 9;10(6):691. DOI: 10.3390/antibiotics10060691
- Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(3):333-41. DOI: 10.1007/s10096-015-2559-7
- Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2475067. DOI: 10.1155/2016/2475067
- Kochan TJ, Nozick SH, Valdes A, Mitra SD, Cheung BH, Lebrun-Corbin M, et al. *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with features of both multidrug-resistance and hypervirulence have unexpectedly low virulence. *Nat Commun.* 2023 Dec 2;14(1):7962. DOI: 10.1038/s41467-023-43802-1
- Tang M, Kong X, Hao J, Liu J. Epidemiological Characteristics and Formation Mechanisms of Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2020 Nov 20;11:581543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.581543
- Arranz R, Mercado G, Martín-Benito J, Giraldo R, Monasterio O, Lagos R, et al. Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *J Struct Biol.* 2012 Apr;178(1):54-60. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.02.015
- Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis.* 2017 Jul 15;65(2):208-215. DOI: 10.1093/cid/cix270
- Lin YT, Siu LK, Lin JC, Chen TL, Tseng CP, Yeh KM, et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. *BMC Microbiol.* 2012 Jan 19;12:13. DOI: 10.1186/1471-2180-12-13
- Chung DR, Lee H, Park MH, Jung SI, Chang HH, Kim YS, et al. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Apr;31(4):481-6. DOI: 10.1007/s10096-011-1334-7
- Schweizer C, Bischoff P, Bender J, Kola A, Gastmeier P, Hummel M, et al. Plasmid-Mediated Transmission of KPC-2 Carbapenemase in *Enterobacteriaceae* in Critically Ill Patients. *Front Microbiol.* 2019 Feb 19;10:276. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00276
- Shaidullina ER, Schwabe M, Rohde T, Shapovalova VV, Dyachkova MS, Matsvay AD, et al. Genomic analysis of the international high-risk clonal lineage *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395. *Genome Med.* 2023 Feb 13;15(1):9. DOI: 10.1186/s13073-023-01159-6
- Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis.* 2014 Nov;20(11):1812-20. DOI: 10.3201/eid2011.140206
- Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, et al. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2018 Aug 27;56(9):e00776-18. DOI: 10.1128/JCM.00776-18
- Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Nov 21;7:483. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00483
- Arca-Suárez J, Rodiño-Janeiro BK, Pérez A, Guijarro-Sánchez P, Vázquez-Ucha JC, Cruz F, et al.; GEMARA-SEIMC/REIPI Enterobacterales Study Group. Emergence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Spain studied by whole-genome sequencing. *Int J Antimicrob Agents.* 2022 Jan;59(1):106456. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106456
- Loucif L, Kassah-Laouar A, Saidi M, Messala A, Chelaghma W, Rolain JM. Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving a Sequence Type 101 Clone in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Nov 21;60(12):7494-7497. DOI: 10.1128/AAC.00525-16
- Low YM, Yap PS, Abdul Jabbar K, Ponnampalavanar S, Karunakaran R, Velayuthan R, et al. The emergence of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia: correlation between microbiological trends with host characteristics and clinical factors. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017 Jan 7;6:5. DOI: 10.1186/s13756-016-0164-x
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 Mar;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12
- Kong Q, Beanan JM, Olson R, Macdonald U, Shon AS, Metzger DJ, et al. Biofilm formed by a hypervirulent (hypermucoviscous) variant of *Klebsiella pneumoniae* does not enhance serum resistance or survival in an *in vivo* abscess model. *Virulence.* 2012 May 1;3(3):309-18. DOI: 10.4161/viru.20383
- Cano V, March C, Insua JL, Aguiló N, Llobet E, Moranta D, et al. *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell Microbiol.* 2015 Nov;17(11):1537-60. DOI: 10.1111/cmi.12466
- Dai P, Hu D. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Lab Anal.* 2022 Dec;36(12):e24743. DOI: 10.1002/jcla.24743

24. Wei DD, Wan LG, Deng Q, Liu Y. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clone of capsular serotype K1 that belongs to sequence type 11 in Mainland China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Jun;85(2):192-4. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.012
25. March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM, et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS One*. 2013;8(2):e56847. DOI: 10.1371/journal.pone.0056847
26. Russo TA, Shon AS, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Pomakov AO, et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PLoS One*. 2011;6(10):e26734. DOI: 10.1371/journal.pone.0026734
27. Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*. 2015 Jul 21;6(4):e00630. DOI: 10.1128/mBio.00630-15
28. Lepuschitz S, Schill S, Stoeger A, Pekard-Amenitsch S, Huhulescu S, Inreiter N, et al. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Sci Total Environ*. 2019 Apr 20;662:227-235. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.179
29. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):107-18. DOI: 10.4161/viru.22718
30. Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):3783-92. DOI: 10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004
31. Поздеев ОК, Федоров ПВ. Энтеробактерии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007;322-349. / Pozdeev OK, Fedorov RV. Enterobakterii: rukovodstvo dlya vrachei. M.: GEOTAR-Media Publ., 2007;322-349. (In Russian).
32. Ahmed SM, Jakribettu RP, Meletath SK, B A, Vpa S. Lower Respiratory Tract Infections (LTRIs): An Insight into the Prevalence and the Antibiogram of the Gram Negative, Respiratory, Bacterial Agents. *J Clin Diagn Res*. 2013 Feb;7(2):253-6. DOI: 10.7860/JCDR/2013/5308.2740
33. Zhang S, Yang G, Ye Q, Wu Q, Zhang J, Huang Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China. *Front Microbiol*. 2018 Mar 1;9:289. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00289
34. Сухорукова МВ, Эйдельштейн МВ, Иванчик НВ, Склеенова ЕЮ, Шайдуллина ЭР, Азизов ИС, и др.; исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия. 2019;21(2):147-159. / Sukhorukova MV, Edelstein MV, Ivanchik NV, Skleenova EYu, Shajdullina ER, Azizov IS, et al.; issledovatel'skaya grupa «MARAFON». Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 21(2):147-159. DOI: 10.36488/cmasc.2019.2.147-159 (In Russian).
35. Чеботарь ИВ, Бочарова ЮА, Подопригора ИВ, Шагин ДА. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(1):4-19. / Chebotar IV, Bocharova YuA, Podoprigrora IV, Shagin DA. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19 (In Russian).
36. Pulzova L, Navratilova L, Comor L. Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbi Drug Resist*. 2017;23(4):413-420. DOI: 10.1089/mdr.2016.0017
37. Heidary M, Bahramian A, Hashemi A, Goudarzi M, Omrani VF, Eslami G, et al. Detection of *acrA*, *acrB*, *aac* (β)-*lb-cr*, and *qepA* genes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2017;64(1):63-69. DOI: 10.1556/030.63.2016.011
38. Xiaoliang W, Huiming H, Chunlei C, Beiwen Z. Genomic characterisation of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:78-80. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.08.023
39. Nishida S, Ono Y. Genomic analysis of a pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 identified in Japan in 2016. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Apr;55(4):105854. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.11.011
40. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis*. 2007 Aug 1;45(3):284-93. DOI: 10.1086/519262
41. Li J, Ren J, Wang W, Wang G, Gu G, Wu X, et al. Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Apr;37(4):679-689. DOI: 10.1007/s10096-017-3160-z
42. Zhan L, Wang S, Guo Y, Jin Y, Duan J, Hao Z, et al. Outbreak by Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates with Carbapenem Resistance in a Tertiary Hospital in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 16;7:182. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00182
43. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2020 Mar;287(3):283-300. DOI: 10.1111/joim.13007
44. Karlsson M, Stanton RA, Ansari U, McAllister G, Chan MY, Sula E, et al. Identification of a Carbapenemase-Producing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolate in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jun 24;63(7):e00519-19. DOI: 10.1128/AAC.00519-19
45. Shen D, Ma G, Li C, Jia X, Qin C, Yang T, et al. Emergence of a Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 23 Strain with a Rare *bla*_{CTX-M-24}-Harboring Virulence Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 26;63(3):e02273-18. DOI: 10.1128/AAC.02273-18
46. Kuzina ES, Novikova TS, Astashkin EI, Fedyukina GN, Kislichkina AA, Kurdyumova NV, et al. Rectal and Tracheal Carriage of Carbapenemase Genes and Class 1 and 2 Integrons in Patients in Neurosurgery Intensive Care Unit. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jul 3;11(7):886. DOI: 10.3390/antibiotics11070886
47. Kuzina ES, Kislichkina AA, Sizova AA, Skryabin YP, Novikova TS, Ershova ON, et al. High-Molecular-Weight Plasmids Carrying Carbapenemase Genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{OXA-48} Coexisting in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains of ST39. *Microorganisms*. 2023 Feb 11;11(2):459. DOI: 10.3390/microorganisms11020459
48. Baquero F, Lanza VF, Baquero MR, Del Campo R, Bravo-Vázquez DA. Microcins in *Enterobacteriaceae*: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front Microbiol*. 2019 Oct 9;10:2261. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02261
49. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*. 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
50. Le MN, Nguyen TH, Trinh VM, Nguyen TP, Kawada-Matsuo M, Kayama S, et al. Comprehensive Analysis of Bacteriocins Produced by the Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* Species Complex. *Microbiol Spectr*. 2023 Jun 15;11(3):e0086323. DOI: 10.1128/spectrum.00863-23
51. Wilkens M, Villanueva JE, Cofré J, Chnaiderman J, Lagos R. Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1997 Aug;179(15):4789-94. DOI: 10.1128/jb.179.15.4789-4794.1997
52. Destoumieux-Garçon D, Thomas X, Santamaria M, Goulard C, Barthélémy M, Boscher B, et al. Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2003 Aug;49(4):1031-41. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03610.x

Информация о соавторах:

Авдеева Виктория Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ларионова Ирина Андреевна, заместитель декана, главный специалист педиатрического факультета, старший преподаватель кафедры микробиологии им. доцента Б.М.Зельмановича ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хохлова Ольга Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Victoria A. Avdeeva, junior researcher at the laboratory of antimicrobial drugs, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Irina A. Larionova, Deputy Dean, Chief Specialist of the Pediatric Faculty, Senior Lecturer at the Associate prof. B.M.Zelmanovich Department of Microbiology, V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Lyubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Sciences), head of the scientific department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga E. Khokhlova, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Борьба с туберкулезом

Исследователи выявили новые молекулы антибиотиков, которые направлены на *Mycobacterium tuberculosis* и делают ее менее патогенной для человека. Кроме того, некоторые из обнаруженных веществ могут позволить возобновить лечение туберкулеза имеющимися препаратами – в том числе штаммов бактерии, которые уже выработали устойчивость к лекарствам.

Разработана альтернативная стратегия лечения заболевания. Были использованы высокопроизводительные методы на основе клеток-хозяев, чтобы проверить способность молекул останавливать размножение бактерий в иммунных клетках человека: Из 10 000 молекул эта процедура позволила выделить несколько, свойства которых они более тщательно изучили в ходе исследования.

В итоге исследователи выявили блокаторы вирулентности, использующие структуры-мишени, принципиально отличные от тех, на которые нацелены классические антибиотики. Эти молекулы, вероятно, приводят к значительно меньшему селективному давлению на бактерию, а значит, и к меньшей резистентности.

Обнаружили, что некоторые из вновь выявленных химических веществ являются молекулами двойного действия. Они не только воздействуют на факторы вирулентности патогена, но и усиливают активность монооксигеназ – ферментов, необходимых для активации обычного антибиотика этионамида. Этионамид – препарат, который уже много десятилетий используется для лечения туберкулеза. Это так называемое пролекарство – вещество, которое должно быть ферментативно активировано в бактерии, чтобы убить ее. Таким образом, открытые молекулы действуют как пролекарства, обеспечивая еще один альтернативный подход к разработке традиционных антибиотиков. Был расшифрован точный молекулярный механизм этого бустерного эффекта. Таким образом, в сочетании с этими новыми активными веществами лекарства, которые уже используются против туберкулеза, могут эффективно применяться и в будущем.

Это открытие предлагает несколько привлекательных отправных точек для разработки новых и крайне необходимых средств против туберкулеза.



Gries R, Chhen J, van Gumpel E, Theobald SJ, Sonnenkalb L, Utpatel C, et al.
Discovery of dual-active ethionamide boosters inhibiting the *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 secretion system.
Cell Chem Biol. 2023 Dec 27;S2451-9456(23)00436-1. DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.12.007

Микробные биопленки – история изучения и современные представления

Т.Ф.Черных¹, О.Ю.Богданова¹, Ю.А.Буковская¹, С.Э.Ржеусский²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Республика Беларусь

В обзорной статье представлена актуальная информация о микробных биопленках, их архитектуре и формировании, истории и методах изучения, мерах борьбы. Акцент сделан в отношении микробных биопленок, имеющих значение в клинической медицине и производстве медицинских товаров, отмечены наиболее распространенные участники биопленок.

Ключевые слова: микробная биопленка, бактерии, архитектура, этапы формирования, меры борьбы, методы изучения

Для цитирования: Черных Т.Ф., Богданова О.Ю., Буковская Ю.А., Ржеусский С.Э. Микробные биопленки – история изучения и современные представления. Бактериология. 2024; 9(2): 67–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-67-74

Microbial biofilms – history of study and modern implications

T.F.Chernykh¹, O.Yu.Bogdanova¹, Yu.A.Bukovskaya¹, S.E.Rzheussky²

¹St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
Saint Petersburg, Russian Federation;

²Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

The review article presents up-to-date information about microbial biofilms, their architecture and formation, history and methods of study, and control measures in a classifying and systematizing manner. The emphasis is placed on microbial biofilms that are important in clinical medicine and the production of medical products, the most common participants of biofilms are noted.

Key words: microbial biofilm, bacteria, architecture, stages of formation, control measures, methods of study.

For citation: Chernykh T.F., Bogdanova O.Yu., Bukovskaya Yu.A., Rzheussky S.E. Microbial biofilms – history of study and modern implications. Bacteriology. 2024; 9(2): 67–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-67-74

Микробная биопленка – это сложная симбиотическая структура, образованная одним или несколькими видами микроорганизмов, образуемая на поверхностях и субстратах, как правило, встроенных в матрикс внеклеточных полимерных веществ. Биопленки формируются для защиты от воздействия окружающей среды, повышения выживаемости, улучшения условий роста и развития колонии. В основе создания и формирования микробной биопленки лежат симбиотические взаимоотношения, обычные в природных сообществах среди как прокариот, так и эукариот, а также между организмами обоих надцарств. Микробные биопленки представляют собой сложную проблему в технической промышленности, медицине, фармации и биотехнологии, решение которой может помочь в борьбе с этим уникальным явлением в мире микробиологии. В этой связи

систематизация и актуализация накопленных знаний о микробных биопленках являются важным аспектом в их изучении.

Исторические основы изучения биопленок и их значения в различных сферах народного хозяйства

О микробных биопленках упоминали в своих работах еще основатели микробиологии. А.Левенгук (1632–1723) наблюдал их в виде зубного налета, Л.Пастер (1822–1895) – в виде скоплений клеток уксуснокислых бактерий в вине. В экологической и технической микробиологии было показано, что биопленки играют важную роль в биообрастании различных поверхностей, например, днища кораблей [1]. Скопления бактерий на поверхностях впервые стали предметом изуче-

Для корреспонденции:

Черных Татьяна Фёдоровна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России
Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А
E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com

Статья поступила 30.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Tatyana F. Chernykh, DSc in Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 14 lit. A Professor Popov str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation
E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com

The article was received 30.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

ния именно морской микробиологии [2]. В настоящее время активно ведутся исследования механизмов морского оброста и поиски борьбы с коррозией материалов, вызываемых микробными биопленками на морской инфраструктуре и оборудовании [3].

С помощью методов электронной микроскопии Jones et al. при изучении морфологии клеток биопленок на капельных фильтрах очистных сооружений показали, что пленки состоят из различных организмов и заключены в матричный материал, представляющий собой полисахарид [4].

В начале 1970-х гг. в медицине в связи с наблюдением за скоплениями клеток бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872; Migula, 1900) [5] в мокроте и легочной ткани хронических больных муковисцидозом появилась концепция биопленочных инфекций и их медицинского значения, стали изучаться проблемы, связанные с такими скоплениями [1, 6].

Термин «биопленка» начал активно употребляться в медицинских работах с 1985 г. благодаря работе Дж.У.Костертон, который указал, что в природе (но не в лабораторных культурах) бактерии покрыты «гликокаликсом» из волокон, которые прикрепляются к поверхностям и другим клеткам [7].

Основные усилия исследователей 1970–1980-х гг. были направлены на исследование биопленок зубного налета [8], которые признаны клиницистами независимой и саморегулирующейся биологической системой, а не просто объединением различных бактерий, а также показано, что биопленки ротовой полости и других слизистых оболочек человека зачастую являются необходимыми этиологическими факторами развития заболеваний [9].

Начиная с 1970-х гг. Г.Чараклис изучал микробные слизи в промышленных системах водоснабжения и показал, что они очень живучи и обладают высокой устойчивостью к хлорсодержащим дезинфицирующим средствам. Основываясь на наблюдениях за зубными бляшками и сидячими сообществами в пресных водоемах, Костертон в 1978 г. выдвинул теорию биопленок, которая объяснила механизмы, с помощью которых микроорганизмы прикрепляются к живым и неживым материалам, а также преимущества, которые дает эта форма существования. С тех пор исследования биопленок в промышленных и экологических условиях, а также в средах, более важных для общественного здравоохранения, в основном шли параллельно друг другу. Большая часть работы за последние два десятилетия опиралась на стандартные методы микробиологического культивирования для характеристики биопленок и данные сканирующей электронной микроскопии.

Два основных события последнего десятилетия существенно повлияли на наше понимание биопленок: использование конфокального лазерного сканирующего микроскопа для характеристики ультраструктуры биопленок [10, 11] и исследование генов, участвующих в клеточной адгезии и формировании биопленок [12, 13].

В общебиологических и экологических работах термин «биопленка» начали употреблять с 1935 г., в технических исследованиях – с 1975 г., в медицинских исследованиях – с 1981 г., когда были опубликованы работы о микробных биопленках зубных налетов [14].

Костертон с коллегами впервые в 1985 г. продемонстрировали повышенную антимикробную резистентность бактерий, растущих в биопленках, по сравнению с бактериями в планктонной форме [15].

Наблюдение за комплексами агрегированных микробов, окруженных самопроизведенной органической матрицей, прилипающими к поверхностям, локализованными в тканях или секретах, имеет долгую историю, однако фундаментальная концепция биопленочной инфекции, понимание ее важности в медицине, представление о повышенной резистентности бактерий в биопленках к антимикробным эффектам сложились менее 50 лет назад. С первых исследований до настоящих дней опубликовано множество статей, посвященных морфолого-биологическим и таксономическим особенностям биопленок, изданы руководства для клинических микробиологов, описывающие методы получения и изучения биопленок, сформулированы рекомендации для профилактики и лечения инфекций, обусловленных биопленками.

Архитектура и этапы формирования микробных биопленок

Биопленки рассматриваются как имеющие огромное биологическое значение структуры, образуемые группами микроорганизмов, состоящие из множества биомолекул, которые обычно определяются как дополнительные полимерные вещества (матрица) биопленки, и наделяющие микроорганизмы специализированными функциями, которыми не обладают микроорганизмы в планктонной форме [7, 16–22].

Показано, что 99% всех бактерий планеты функционируют в составе биопленок, только 1% бактерий живет в планктонной форме. Порядка 65% бактериальных инфекций ассоциированы с биопленками [23, 24]. Клетки составляют 15% объема биопленки, матрикс – до 85% [24].

Основные особенности микробных биопленок

1. Биопленка состоит из одного или нескольких видов микроорганизмов, формирующих контакты и взаимодействие между клетками, формируя «ощущение кворума» (quorum sensing/QS) – механизм межклеточной коммуникации, обеспеченный сигнальными молекулами (циклический дигуанилат (c-di-GMP), малые РНК (мРНК)), который синхронизирует экспрессию генов в ответ на плотность клеток популяции, координированно активирует созревание и разборку биопленки [17, 25–33].

2. Биопленки имеют органическую матрицу, включающую 1) матричные биополимеры, синтезируемые микробами (полисахариды, экстрацеллюлярная ДНК, белки), 2) структуры матрикса, захваченные микробами из окружающей среды, состав которых напрямую зависит от характера ткани, на которой образовалась биопленка [18, 34–36].

3. Биопленки – это самоорганизующиеся микробные структуры, которые способны оптимизировать свои функции и регулировать различные метаболические активности в пользу сообщества. Феномен «читинга» (англ. cheating – обман, мошенничество), поддерживающий дефектные клетки, обуславливает их участие в пленкообразовании при отсутствии способности синтезировать матрикс [18, 37].

4. Биопленки прикреплены к поверхности и при переходе от планктонных (свободно плавающих) организмов к прикрепленным клеткам претерпевают глубокие изменения [38].

5. Биопленки наделяют участников защитными свойствами, которые обуславливают их усиленную патогенность, устойчивость к антимикробным средствам [39–42]. В свою очередь, гены патогенности и устойчивости к антимикробным веществам оказывают влияние на биопленку [42, 43].

6. Биопленки являются серьезной проблемой в клинике инфекционных заболеваний, контаминации поверхностей, селекции антибиотикорезистентных штаммов [6, 20, 23, 40, 41, 44–51]. Эволюция бактерий в составе биопленки приводит к появлению клеток в состоянии VBNC (viable, but not cultivatable) – жизнеспособные, патогенные, но не культивируемые [52, 53].

7. Биопленки могут иметь повышенную уязвимость к воздействию фагов, которые обладают разрушающим ферментом полисахарид-деполимеразой, что, в свою очередь, может быть положено в основу борьбы с ними [54–57].

Таким образом, микробная биопленка включает следующие элементы: поверхность субстрата, микробы-участники, полимерный матрикс, образуя саморегулирующуюся экосистему, имеет определенную архитектуру, обусловленную тесным взаимодействием клеток с помощью сигнальных молекул.

Факторы, влияющие на образование биопленок [58]:

- поверхность субстрата;
- кондиционирующая пленка на субстрате;
- гидродинамика, характеристики водной среды (для водных биопленок);
- характеристики микробных клеток – участников биопленки;
- факторы окружающей среды (температура, концентрация глюкозы, соленость) [57, 59].

Этапы формирования биопленки [23, 58, 60] (рисунок).

Этап 1. *Адгезия*: на поверхности субстрата образуется кондиционирующий слой, представляющий собой рыхлую совокупность углеводов и белков, которая в гидратированной среде соединяется с минералами. Он привлекает микробные клетки, которые начинают прикрепляться к поверхности.

Этап 2. *Фиксация*: как только образуется кондиционирующий слой, на поверхности накапливается электрический заряд, который притягивает бактерии с противоположным зарядом, что приводит к необратимому прикреплению микробных клеток [28]. Заряды достаточно слабы, на этой стадии микроорганизмы можно легко удалить с помощью мягкого очищающего и дезинфицирующего средства.

Этап 3. *Развитие*: бактерии прикрепляются друг к другу, секретируя внеклеточный полимерный матрикс. На этом

этапе формируются микроколонии, происходит распространение и рост биопленки.

Этап 4. *Созревание*: среда биопленки состоит из богатого питательными веществами матрикса, который удерживает бактерии в среде, поддерживает их рост и фенотипическую изменчивость. На этом этапе возникает QS, происходит выделение сигнальных молекул. В зрелой биопленке уже присутствуют сложные диффузионные каналы для транспортировки питательных веществ, кислорода и других компонентов, необходимых для роста бактерий, а также для удаления продуктов жизнедеятельности и мертвых клеток.

Этап 5. *Дисперсия*: процесс рассеивания биопленки, при котором активно растущие клетки постепенно теряют дочерние клетки. Факторами фрагментации биопленки могут стать дефицит питательных веществ, стресс, механическое, физическое или химическое воздействие. Отделившиеся клетки могут повторно заселять поверхность, образуя новую биопленку.

Методы детекции биопленок

Методы обнаружения и исследования ультраструктуры биопленок и их апробация подробно рассмотрены в обзоре [53].

Основные методы исследования биопленок

1. Экспресс-методы детекции биопленок с помощью красителей и последующей фотометрии [61], основанные на иммобилизации микрогранул при формировании биопленки на поверхности [62].

2. Изучение топографии биопленки методом оптической и электронной микроскопии в различных модификациях с использованием современного программного обеспечения [63, 64]

3. Исследования структурных компонентов биопленок атомно-силовой микроскопией (сканирующая зондовая микроскопия) [65], сканирующей просвечивающей рентгеновской микроскопией [66, 67], оптической когерентной томографией биопленок [68], спектроскопией, проточной цитофлуориметрией [69].

4. Генетические методы исследования биопленок с помощью полимеразной цепной реакции и секвенирование биополимеров [23, 70].

Виды биопленок и их участники

В клинической медицине наиболее подробно изучены следующие микробные биопленки [71].

Зубной налет – может включать следующих участников: *Streptococcus mutans*, *Lactobacteria* sp., *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium* spp. (*F. nucleatum*, *F. varium*, *F. necrophorum*), *Peptostreptococcus* (*Micromonas*) *micro*, *Porphyromonas endodontalis*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus anaerobius*, в инфицированных корневых каналах в состав биопленок могут входить *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Alistipes putredinis*, *Escherichia coli*, *Peptococcus* sp., *Mitsuokella multacida*, *Candida* sp. и многие другие виды [72–75].

Кишечный микробиом – *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Cronobacter* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., грибы рода *Candida*; факультативно-анаэробные микроорганизмы: *Bifidobacterium*

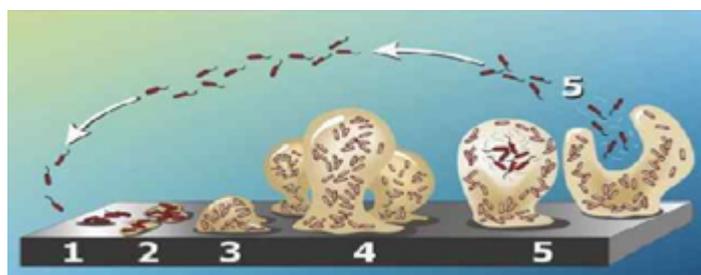


Рисунок. Этапы формирования биопленки [60].

Figure. Stages of biofilm formation [60].

spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp. [46, 76–79].

Инфекционный эндокардит – в 80–90% случаев *Streptococcus* sp. и *Staphylococcus aureus* являются причиной заболевания, в состав биопленок клапана могут входить *Enterococcus* sp., *Haemophilus* sp., *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* и *Kingella kingae*, грибки [58, 80].

Муковисцидоз – в состав биопленки входят *Lactobacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Stenotropomonas* sp., *Stenotropomonasmaltophilia* sp., *Proteus* sp., *Streptococcus* sp., *Streptococcus oralis/mitis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* [81, 82].

Инфицированные раны – наиболее часто встречающимися бактериями в биопленках хронических ран являются патогены ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. [83].

Инфицированные медицинские инструменты, оборудование, эндопротезы, катетеры [58, 71]:

- в биопленке внутривенных и мочеполовых катетеров обнаруживаются: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Candida albicans*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* и другие грамотрицательные организмы;

- в биопленке контактных линз чаще обнаруживаются бактерии родов *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*;

- в биопленке внутриматочных спиралей – *Lactobacillus*, *Corinebacterium*, *C. albicans*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis/faecium*;

- ортопедические эндопротезы наиболее часто поражаются биопленками, имеющими в составе *S. aureus/epidermidis/lugdunensis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*. Особую опасность для медицинских инструментов и эндопротезов имеют особо устойчивые к антибиотикам микробы, такие как MRSA (метициллин-резистентный *S. aureus*) и MRSE (метициллин-резистентный *S. epidermidis*).

В природных экосистемах наиболее известны такие биопленки, как «лунное молоко», биопленки обрастания поверхностей в водных экосистемах, биопленки железосодержащих вод, цианобактериальные маты и другие микробные сообщества.

Вероятность инициации формирования микробных биопленок принадлежит следующим бактериям [41]:

- грамположительные палочки рода *Clostridium*, грамположительные кокки рода *Sarcina* – 15–20%;
- грамположительные кокки рода *Aerococcus* – до 37%;
- бактерии рода *Mycoplasma* – >60%;
- коагулазоположительные стафилококки – 55–70%;
- грамотрицательные бактерии рода *Legionella* – 73–85%;
- β-негемолитические стрептококки, грамположительные бактерии рода *Peptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Listeria*, *Leptotrichia*, бактерии семейств *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*), *Corynebacteriaceae* (*Corynebacterium*) – до 90%;
- коагулазоотрицательные стафилококки – 93%;
- бактерии рода *Ureaplasma* – 80–95%;
- грамположительные кокки рода *Lactococcus* – 96%;
- спириллы рода *Helicobacter* – 97%;
- α- и β-гемолитические стрептококки, грамположительные бактерии рода *Gemella*, бактерии рода *Fusobacterium* – 99%;

- грамположительные кокки рода *Enterococcus* в зависимости от вида – 75–100%;
- бактерии порядка *Enterobacterales* (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*), семейства *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), семейства *Vibrionaceae* (*Vibrio*) – 100%;
- не изучена вероятность для бактерий родов *Peptostreptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Moraxella*, *Brucella*, *Acinetobacter*, *Pasteurella*, *Francisella*, *Gardnerella*, *Acidimicrococcus*, *Campylobacter*, *Bifidobacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Actinotadura*, семейства *Nocardiaceae* (*Nocardia*, *Rhodococcus*), спирохет рода *Leptospira*, семейства *Spirochaetaceae* (*Treponema*, *Borrelia*), риккетсий и хламидий.

Устойчивость биопленок к антимикробным воздействиям и меры борьбы с биопленками

В биопленке бактерии становятся на 1–3 порядка менее подвержены воздействию противомикробных агентов по сравнению с планктонной формой. Для уничтожения биопленки концентрацию гипохлорита натрия (основное дезинфицирующее средство) необходимо увеличить в 600 раз. На биопленки не оказывают должного воздействия четвертичные аммонийные соединения, полимерные и мономерные производные гаунидина (хлоргексидин), хлорсодержащие соединения (хлорамин), альдегиды и спирты в обычных бактерицидных концентрациях [24, 58].

Бактерии в биопленках демонстрируют дискретные физиологические реакции, такие как снижение скорости метаболизма и усиление межклеточной коммуникации, что помогает развивать устойчивость к антибиотикам или снижать их действие. В основе устойчивости биопленок лежат следующие механизмы:

- матричные полисахариды действуют как диффузионный барьер, замедляя проникновение или не пропускают часть антимикробных препаратов во внутренние слои биопленки;
- в микроокружении биопленки некоторые клетки впадают в состояние медленного роста или голодания из-за ограничения питательных веществ или накопления вредных метаболитов, становятся «персистерами», которые неуязвимы для многих противомикробных агентов;
- дифференциация бактериальной субпопуляции в биопленке напоминает процесс спорообразования, который имеет характерный фенотип с высокой устойчивостью (биологически запрограммированный ответ на бактериальные прикрепленные формы), защищающий их от антибактериального воздействия;
- наличие нейтрализующих антибиотики ферментов также способствует устойчивости биопленки к антибиотикам.

Хотя интенсивное и настойчивое лечение антибиотиками эффективно уменьшает биопленку и контролирует обострения хронических биопленочных инфекций, оно не способно до конца устранить биопленочные инфекции. В большинстве случаев лечения одним антибиотиком недостаточно для устранения инфекций биопленки, для их лечения рекомендуется комбинированная терапия. Хорошие результаты дает комбинация антибиотиков с бактериофагами или антисептиками.

- medicine, and biotechnology. *Microbiology*. 2015;84(6):623-644. DOI: 10.7868/S0026365615060117 (In Russian).
18. Чеботарь ИВ, Маянский АН, Маянский НА. Матрикс микробных биопленок. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016;18(1):9-19. / Tchebotar IV, Mayansky AN, Mayansky NA. Matrix of microbial biofilms. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;18(1):9-19. (In Russian).
19. Hall CW, Hinz AJ, Gagnon LB, Zhang L, Nadeau JP, Copeland S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance Gene *ndvB* Expression Requires the RpoS Stationary-Phase Sigma Factor. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Mar 19;84(7):e02762-17. DOI: 10.1128/AEM.02762-17
20. Хрянин АА. Биоплёнки микроорганизмов: современные представления. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020;5-6:70-7. / Khryanin AA. Microbial Biofilms: Modern Concepts. *Antibiot Khimioter (Antibiotics and Chemotherapy)*. 2020;5-6:70-7. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-70-77 (In Russian).
21. Choudhary P, Singh S, Agarwal V. Microbial biofilms. 2020. Available at: <https://doi:10.5772/intechopen.90790> (accessed 10.10.2023).
22. Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Feb;21(2):70-86. DOI: 10.1038/s41579-022-00791-0
23. Галимзянов ХМ, Башкина ОА, Досмуханова ЭГ, Абдрахманова РО, Демина ЮЗ, Даудова АД, и др. Клиническое значение биопленкообразования у бактерий. *Астраханский медицинский журнал*. 2018;4:32-42. / Galimzyanov KhM, Bashkina OA, Dosmukhanova EG, Abdrakhamanova RO, Demina YuZ, Daudova AD, et al. Clinical importance of biofilm formation in bacteria. *Astrakhan Medical Journal*. 2018;4:32-42. DOI: 10.17021/2018.13.4.32.42 (In Russian).
24. Емшанов ОВ. Разработки для детекции и деструкции биологических пленок бактерий на абиотических поверхностях. Сайт BFR Laboratoria. [Электронный ресурс]. / Emshanov OV. Razrabotki dlya detektsii i destrukttsii biologicheskikh plenok bakterii na abioticheskikh poverkhnostyakh. Sait BFR Laboratoria. [Electronic resource]. Available at: <https://foodsmi.com/data/public/1159/2226/686089ruksii-biologicheskikh-plyonok-oleg-emshanov.pdf> (accessed 10.10.2023). (In Russian).
25. Liu L, Tan X, Jia A. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation – a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2012 Mar 4;52(3):271-8.
26. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Apr;18:96-104. DOI: 10.1016/j.mib.2014.02.008
27. Sharma IM, Petchiappan A, Chatterji D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. *IUBMB Life*. 2014 Dec;66(12):823-34. DOI: 10.1002/iub.1339
28. Humphries J, Xiong L, Liu J, Prindle A, Yuan F, Arjes HA, Tsimring L, Süel GM. Species-Independent Attraction to Biofilms through Electrical Signaling. *Cell*. 2017 Jan 12;168(1-2):200-209.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.014
29. Хайтович АБ, Мурейко ЕА. Чувство кворума микроорганизмов как фактор патогенности. *Таврический медико-биологический вестник*. 2018;21(1):206-212. / Khaitovich AB, Mureiko EA. Quorum sensing of microorganisms as a factor of pathogenicity. *Tavrisheskii mediko-biologicheskii vestnik*. 2018;21(1):206-212. (In Russian).
30. Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Jun;17(6):371-382. DOI: 10.1038/s41579-019-0186-5
31. Yi L, Li J, Liu B, Wang Y. Advances in research on signal molecules regulating biofilms. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019 Aug 5;35(8):130. DOI: 10.1007/s11274-019-2706-x
32. Ларюшина ИЭ. Основные механизмы «чувства кворума» и их реализация в мультимикробном сообществе (обзор). *Животноводство и кормопроизводство*. 2020;4:160-173. / Laryushina I. The main mechanisms of "quorum sense" and their implementation in the multimicrobial community (review). *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2020;4:160-173. DOI: 10.33284/2658-3135-103-4-160 (In Russian).
33. Cox CA, Bogacz M, El Abbar FM, Browning DD, Hsueh BY, Waters CM, et al. The *Campylobacter jejuni* Response Regulator and Cyclic-Di-GMP Binding CbrR Is a Novel Regulator of Flagellar Motility. *Microorganisms*. 2021 Dec 31;10(1):86. DOI: 10.3390/microorganisms10010086
34. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading)*. 2001 Jan;147(Pt 1):3-9. DOI: 10.1099/00221287-147-1-3
35. Sponza DT. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microb Technol*. 2003;32:375-385.
36. Baelo A, Levato R, Julián E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, et al. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J Control Release*. 2015 Jul 10;209:150-8. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028
37. Boyle KE, Heilmann S, van Ditmarsch D, Xavier JB. Exploiting social evolution in biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Apr;16(2):207-12. DOI: 10.1016/j.mib.2013.01.003
38. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
39. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001 Jan;9(1):34-9. DOI: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2
40. Каюмов АР, Тризна ЕЮ, Шарафутдинов ИС, и др. Биопленки как фактор патогенности *Staphylococcus aureus*: подходы к терапии. Под ред. Каюмова АР. Федеральное агентство по образованию, Казанский федеральный университет. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 2017. / Kayumov AR, Trizna EYu, Sharafutdinov IS, et al. Bioplenki kak faktor patogennosti *Staphylococcus aureus*: podkhody k terapii. Pod red. Kayumova AR. Federal'noe agentstvo po obrazovaniyu, Kazanskii federal'nyi universitet. Kazan': Izd-vo Kazanskogo un-ta, 2017. (In Russian).
41. Окулич ВК, Кабанова АА, Плотников ФВ. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ, 2017. / Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Mikrobnye bioplenki v klinicheskoi mikrobiologii i antibakterial'noi terapii. Vitebsk: VGMU, 2017. (In Russian).
42. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 May 1;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010
43. Sultan M, Arya R, Chaurasia AK, Kim KK. Sensor histidine kinases kdpD and aauS regulate biofilm and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Oct 10;13:1270667. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1270667
44. Анганова ЕВ, Савилов ЕД, Ушкарёва ОА, Аблов АМ, Духанина АВ. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок. *Бюллетень ВЧНЦ СО РАМН*. 2014;5(99):34-37. / Anganova EV, Savilov YeD, Ushkareva OA, Ablov AM, Dukhanina AV. Ability of pathogenic and opportunistic pathogenic enterobacteriaceae to the formation of biofilms. *Byulleten' VSNTs SO RAMN*. 2014;5(99):34-37. (In Russian).
45. Корниенко МА, Копыльцов ВН, Шевлягина НВ, Диденко ЛВ, Любасовская ЛА, Припутневич ТВ, и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016;1:18-25. / Kornienko MA, Kopyltsov VN, Shevlyagina NV, Didenko LV, Lyubasovskaya LA, Iliina EN, et al. The ability of various strains of staphylococcus to create biofilms and their effect on cells of the human body. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;1:18-25. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-18-25 (In Russian).
46. Кононенко АБ, Павлова ИБ, Банникова ДА, Бритова СВ, Савинова ЕП, Набиуллина ДН. Методологические подходы к изучению формирования биопленок условно-патогенными и патогенными энтеробактериями. *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. 2018;1(25):50-57. / Kononenko AB, Pavlova IB, Bannikova DA, Britova SV, Savinova EP, Nabiullina DN. Methodological approaches to the study of formation of biofilms by conditionally pathogenic and pathogenic enterobacteriaceae. *Problems of veterinary sanitation, hygiene and ecology*. 2018;1(25):50-57. (In Russian).

47. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018 Jan;16(1):51-65. DOI: 10.1080/14787210.2018.1417036
48. Байматов РА, Нурузова ЗА, Эргашева ЗН. Биопленка – как форма существования микроорганизмов. *Журнал реабилитации.* 2019;3:58-68. / Baymatov RA, Nuruzova ZA, Ergasheva ZN. Microbial biofilm – as a form of the existence of microorganisms. *Re-Health Journal.* 2019;3:58-68. (In Russian).
49. Vyas HKN, Proctor EJ, McArthur J, Gorman J, Sanderson-Smith M. Current Understanding of Group A Streptococcal Biofilms. *Curr Drug Targets.* 2019;20(9):982-993. DOI: 10.2174/1389450120666190405095712
50. Плотников ФВ, Мовсесян НА, Лептеева ТН, Торосян ТА, Земко ВЮ, Ильин ЕА. Иммуитет и бактериальные биопленки: современное состояние вопроса (обзор литературы). *Вестник ВГМУ.* 2021;3:7-15. / Plotnikov PV, Movsesyan NA, Lepteeva TN, Torosyan TA, Ziamko VYu, Ilyin EA. Immunity and bacterial biofilms: current status of the matter (literature review). *Vestnik VGUMU.* 2021;3:7-15. DOI: 10.22263/2312-4156.2021.3.7 (In Russian).
51. Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Mol Biol Rep.* 2021 Oct;48(10):6987-6998. DOI: 10.1007/s11033-021-06690-6
52. Di Gregorio L, Congestri R, Tandoi V, Neu TR, Rossetti S, Di Pippo F. Biofilm diversity, structure and matrix seasonality in a full-scale cooling tower. *Biofouling.* 2018 Nov;34(10):1093-1109. DOI: 10.1080/08927014.2018.1541454
53. Кропотов ВС, Заславская МИ, Игнатова НИ, Кряжев ДВ. Современные методы исследования ультраструктуры бактериальных биопленок (обзор литературы). *Проблемы медицинской микологии.* 2022;4:10-19. / Kropotov VS, Zaslavskaya MI, Ignatova NI, Kryazev DV. Modern methods of studying the ultrastructure of bacterial biofilm (literature review). *Problems in Medical Mycology.* 2022;4:10-19. DOI: 10.24412/1999-6780-2022-4-10-19 (In Russian).
54. Дрюккер ВВ, Горшкова АС. Бактериофаги и их функционирование в биопленках. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология.* 2012;3:8-16. / Drucker VV, Gorshkova AS. Bacteriophages and their functioning in the biofilms. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology.* 2012;3:8-16. (In Russian).
55. Latka A, Drulis-Kawa Z. Advantages and limitations of microtiter biofilm assays in the model of antibiofilm activity of *Klebsiella* phage KP34 and its depolymerase. *Sci Rep.* 2020 Nov 23;10(1):20338. DOI: 10.1038/s41598-020-77198-5
56. Smug BJ, Majkowska-Skropek G, Drulis-Kawa Z. PhREEPred: Phage Resistance Emergence Prediction Web Tool to Foresee Encapsulated Bacterial Escape from Phage Cocktail Treatment. *J Mol Biol.* 2022 Jul 30;434(14):167670. DOI: 10.1016/j.jmb.2022.167670
57. Спирина АА, Русакова МВ. Влияние параметров окружающей среды на образование биопленок. *Материалы XIII Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум».* / Spirina AA, Rusakova MV. Vliyanie parametrov okruzhayushchei sredy na obrazovanie bioplenok. *Materialy XIII Mezhdunarodnoi studencheskoi nauchnoi konferentsii «Studencheskii nauchnyi forum».* Available at: <https://scienceforum.ru/2021/article/2018024230> (accessed 05.11.2023). (In Russian).
58. Choudhary P, Singh S, Agarwal V. Microbial biofilms. 2020. Available at: <https://doi:10.5772/intechopen.90790> (accessed 10.10.2023).
59. Есикова АИ, Бузалева ЛС, Кривошеева АМ. Роль гидробионтов и бактериальных биопленок в выживаемости возбудителей сапрозоонозов в морских экосистемах (обзор литературы). *Экология человека.* 2017;10:3-8. / Eskova AI, Buzoleva LS, Krivosheeva AM. The role of hydrobionts and bacterial biofilms in survivability of saprozooses in the marine ecosystem (literature review). *Ekologiya cheloveka (Human Ecology).* 2017;10:3-8. DOI: 10.33396/1728-0869-2017-10-3-8 (In Russian).
60. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens.* 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
61. Методические рекомендации 4.2.0161-19. Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах. М., 2019. / Metodicheskie rekomendatsii 4.2.0161-19. Metody indikatsii biologicheskikh plenok mikroorganizmov na abioticheskikh objektakh. Moscow, 2019. (In Russian).
62. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017 May;43(3):313-351. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146
63. Garcez AS, Barros LC, Fernandes MRU, Fujii DN, Suzuki SS, Nepomuceno R. Fluorescence image and microbiological analysis of biofilm retained around healthy and inflamed orthodontic miniscrews. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Jun;30:101707. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101707
64. Rocha MP, Santos MS, Rodrigues PLF, Araújo TSD, de Oliveira JM, Rosa LP, et al. Photodynamic therapy with curcumin in the reduction of enterococcus faecalis biofilm in bone cavity: rMicrobiological and spectral fluorescence analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Mar;33:102084. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102084
65. Парфенов ВА, Юдин ИА. Атомно-силовая микроскопия и ее применения в науке, технике и реставрации. *Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ».* 2015;9:61-70. / Parfenov VA, Yudin IA. Atomic force microscopy and its application in science, engineering and restoration. *Izvestiya SPbGETU «LETI».* 2015;9:61-70. Available at: <https://izv.etu.ru/assets/files/izv-etu-9-2015-61-70.pdf> (accessed 10.10.2023). (In Russian).
66. Divya M, Govindarajan M, Karthikeyan S, Preetham E, Alharbi NS, Kadaikunnan S, et al. Antibiofilm and anticancer potential of β -glucan-binding protein-encrusted zinc oxide nanoparticles. *Microb Pathog.* 2020 Apr;141:103992. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.103992
67. Leoney A, Karthigeyan S, Asharaf AS, Felix AJW. Detection and Categorization of Biofilm-forming *Staphylococcus aureus*, *Viridans streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolated from Complete Denture Patients and Visualization Using Scanning Electron Microscopy. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2020 Sep 28;10(5):627-633. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_256_20
68. Hou J, Wang C, Rozenbaum RT, Gusnaniar N, de Jong ED, Woudstra W, et al. Bacterial Density and Biofilm Structure Determined by Optical Coherence Tomography. *Sci Rep.* 2019 Jul 5;9(1):9794. DOI: 10.1038/s41598-019-46196-7
69. Пучков ЕО. Методы количественного анализа единичных клеток микроорганизмов. *Микробиология.* 2019;88(1):3-18. / Puchkov EO. Quantitative methods for single-cell analysis of microorganisms. *Microbiology.* 2019;88(1):3-18. DOI: 10.1134/S0026365619010130 (In Russian).
70. Belibasakis GN, Manoil D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *J Dent Res.* 2021 Jan;100(1):21-28. DOI: 10.1177/0022034520949851
71. Марданова АМ, Кабанов ДА, Рудакова НЛ, и др. Биопленки: основные методы исследования. *Учебно-методическое пособие.* Казань: К(П)ФУ, 2016. / Mardanova AM, Kabanov DA, Rudakova NL, et al. Bioplenki: osnovnyye metody issledovaniya. *Uchebno-metodicheskoe posobie.* Kazan': K(P)FU, 2016. (In Russian).
72. Simain F, Rompen E, Heinen E. Biofilms bactériens et médecine dentaire [Dental biofilms]. *Rev Med Liege.* 2010 Oct;65(10):569-73.
73. Хавкин АИ, Ипполитов ЮА, Алешина ЕО, Комарова ОН. Микробиота и болезни полости рта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2015;6(118):78-81. / Khavkin AI, Ippolitov YA, Aleshina EO, Komarova ON. Microflora and oral disease. *Eksperimental'naiia i klinicheskaiia gastroenterologiiia (Experimental and Clinical Gastroenterology).* 2015;6(118):78-81. (In Russian).
74. Расков АА, Громова СН, Пышкина ОА, Кайсина ТН, Колевых ЕП, Мальцева ОА, и др. Состав биопленки корневого канала при хронических формах периодонтитов (обзор литературы). *Вятский медицинский вестник.* 2021;70:95-98. / Raskov AA, Gromova SN, Pyshkina OA, Kaysina TN, Kolevatykh EP, Maltseva OA, et al. Composition of root canal biofilm in chronic forms of periodontitis (literature review). *Vyatskii meditsinskii vestnik.* 2021;70:95-98. DOI: 10.24411/2220-7880-2021-10186 (In Russian).

75. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J.* 2022 May;55 Suppl 3:512-530. DOI: 10.1111/iej.13677
76. Романова ЮМ, Гинцбург АЛ. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011;3:99-109. / Romanova YuM, Gintsburg AL. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2011;3:99-109. (In Russian).
77. Рыбальченко ОВ, Бондаренко ВМ. Образование биопленок симбионтными представителями микробиоты кишечника как форма существования бактерий. *Вестник СПбГУ.* 2013;11(1):179-186. / Rybalchenko OV, Bondarenko VM. Biofilm formation of human intestinal symbiotic representatives of microbiota as a form of bacterial life. *Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine.* 2013;11(1):179-186. (In Russian).
78. Sicard JF, Le Bihan G, Vogelee P, Jacques M, Harel J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Sep 5;7:387. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00387
79. Артюх ТВ, Соколова ТН, Шейбак ВМ. Современные способы исследования микробных биопленок кишечника. *Гепатология и гастроэнтерология.* 2021;1:30-36. / Artyukh TV, Sokolova TN, Sheibak VM. Modern methods for researching microbial biofilms of the enterobacteriaceae family. *Hepatology and Gastroenterology.* 2021;1:30-36. DOI: 10.25298/2616-5546-2021-5-1-30-36 (In Russian).
80. Гладких ПГ. Значение микробных биопленок в инфекционной патологии человека (обзор). *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание.* 2015;1. / Gladkih PG. Importance of biofilms in infection pathology of human (review). *Journal of New Medical Technologies. Elektronnoe izdanie.* 2015;1. DOI: 10.12737/7834 (In Russian).
81. Mihai MM, Holban AM, Giurcaneanu C, Popa LG, Oanea RM, Lazar V, et al. Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(16):1552-76. DOI: 10.2174/1568026615666150414123800
82. Тец ВВ, Артеменко НК, Вечерковская МФ, Тец ГВ. Амилоид в биопленках бактерий при муковисцидозе. *Практическая пульмонология.* 2017;2:72-75. / Tets VV, Artemenko NK, Vechevskaya MF, Tets GV. Amyloid in bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis. *Prakticheskaya pul'monologiya.* 2017;2:72-75. (In Russian).
83. Goswami AG, Basu S, Banerjee T, Shukla VK. Biofilm and wound healing: from bench to bedside. *Eur J Med Res.* 2023 Apr 25;28(1):157. DOI: 10.1186/s40001-023-01121-7
84. Nie M, Dong Y, Cao Q, Zhao D, Ji S, Huang H, Jiang M, Liu G, Liu Y. CRISPR Contributes to Adhesion, Invasion, and Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae* by Repressing Capsular Polysaccharide Production. *Microbiol Spectr.* 2022 Aug 31;10(4):e0211321. DOI: 10.1128/spectrum.02113-21

Информация о соавторах:

Богданова Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России

Буковская Юлия Александровна, ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России

Ржеусский Сергей Эдуардович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации Витебского государственного медицинского университета

Information about co-authors:

Olga Yu. Bogdanova, PhD in Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University", Ministry of Health of the Russian Federation

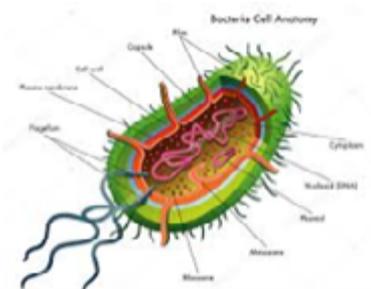
Yulia A. Bukovskaya, Assistant, Department of Microbiology, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of the Russian Federation

Sergey E. Rzhessky, PhD in Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacy, Vitebsk State Medical University

НОВОСТИ НАУКИ

Плектазин воздействует бактериальную клеточную стенку

Устойчивость к противомикробным препаратам является основной причиной смертности, требующей разработки новых антибиотиков. Грибковый антибиотик плектазин представляет собой эукариотический защитный пептид хозяина, который блокирует синтез бактериальной клеточной стенки. Используя комбинацию твердотельного ядерного магнитного резонанса, атомно-силовой микроскопии и анализа активности, показано, что плектазин использует чувствительный к кальцию супрамолекулярный механизм уничтожения. Эффективное и селективное связывание целевого липида II, предшественника клеточной стенки с незаменимым пирофосфатом, достигается за счет олигомеризации плектазина в плотные супраструктуры, которые образуются только на бактериальных мембранах, содержащих липид II. Олигомеризация и целевое связывание плектазина взаимозависимы и усиливаются за счет координации ионов кальция с заметным анионным пятном плектазина, вызывая аллостерические изменения, которые заметно улучшают активность антибиотика. Структурные знания о том, как защитные пептиды хозяина нарушают синтез клеточной стенки, вероятно, позволят разработать более эффективные кандидаты лекарственных препаратов.



Jekhmane S, Derks MGN, Maity S, Slingerland CJ, Tehrani KHME, Medeiros-Silva J, et al. Host defence peptide plectasin targets bacterial cell wall precursor lipid II by a calcium-sensitive supramolecular mechanism. *Nat Microbiol.* 2024 May 23. DOI: 10.1038/s41564-024-01696-9

Francisella tularensis subsp. *mediasiatica*: филогеография, патогенность и экология

В.В.Евсеева, И.В.Бахтеева, А.Н.Мокриевич, В.С.Тимофеев

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

Francisella tularensis – этиологический агент особо опасного заболевания, называемого туляремией. В рамках вида *F. tularensis* выделяют два патогенных подвида – *F. tularensis* subsp. *holarctica*, широко распространенный в северном полушарии, и *F. tularensis* subsp. *tularensis*, ареал распространения которого ограничен Северной Америкой. Третий подвид – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* – до сих пор остается наименее изученным. В этом обзоре обобщены данные современных исследований данного подвида. Приведены сведения об ареале его распространения, рассмотрены его внутривидовая структура и обсуждается вопрос его патогенности, которая для мышей (но не для морских свинок) значительно выше, чем таковая подвида *holarctica*. Выдвинуты гипотезы, объясняющие противоречие между высокой патогенностью штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* для лабораторных мышей и отсутствием подтвержденных случаев туляремии человека, вызванной этим подвидом.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, подвид *mediasiatica*, VNTR, MLVA, эндосимбионт

Для цитирования: Евсеева В.В., Бахтеева И.В., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*: филогеография, патогенность и экология. Бактериология. 2024; 9(2): 75–80. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-75-80

Francisella tularensis subsp. *mediasiatica*: phylogeography, pathogenicity and ecology

V.V.Evseeva, I.V.Bakhteeva, A.N.Mokrievich, V.S.Timofeev

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

Francisella tularensis is the etiological agent of a highly dangerous disease called tularemia. Two *F. tularensis* subspecies are known to be pathogenic for humans – *F. tularensis* subsp. *holarctica* common throughout the Northern Hemisphere and *F. tularensis* subsp. *tularensis*, whose distribution area is limited to North America. The third subspecies, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* is still the least studied. This review summarizes the data from modern studies of this subspecies. We provide information about its distribution area, consider its intra-subspecies structure and discuss the issue of its pathogenicity, which for mice (but not for guinea pigs) is significantly higher than that of the subsp. *holarctica*. Hypotheses have been put forward explaining the contradiction between the high pathogenicity of strains of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* for laboratory mice and the lack of confirmed cases of human tularemia caused by this subspecies.

Key words: *Francisella tularensis*, subspecies *mediasiatica*, VNTR, MLVA, endosymbiont

For citation: Evseeva V.V., Bakhteeva I.V., Mokrievich A.N., Timofeev V.S. *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*: phylogeography, pathogenicity and ecology. Bacteriology. 2024; 9(2): 75–80. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-75-80

Туляремия – это особо опасное чумоподобное заболевание, поражающее широкий круг животных, в т.ч. и человека. Этиологический агент туляремии – небольшая грамтрицательная аэробная коккобацилла *Francisella tularensis*. В рамках вида *F. tularensis* выделяют два патогенных подвида [1]. *F. tularensis* subsp. *holarctica* широко распространен в северном полушарии. Ареал распространения *F. tularensis* subsp. *tularensis* ограничен Северной

Америкой [1]. Также можно упомянуть, что *Francisella novicida* иногда рассматривается как *F. tularensis* subsp. *novicida*, но его таксономический статус остается дискуссионным, и в этой статье мы не рассматриваем его как подвид туляремийного микроба [1]. Последний подвид – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* – до сих пор остается наименее изученным. Изначально он был выделен в Средней Азии, что и обусловило подвидовое название – subsp. *mediasiatica*, или средне-

Для корреспонденции:

Евсеева Вера Васильевна, 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, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-01-17

Статья поступила 10.01.2024, принята к печати 28.06.2024

© Издательство «Династия», 2024

Тел./факс: +7 (495) 660-6004, e-mail: red@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru

For correspondence:

Vera V. Evseeva, Researcher Laboratory of Antrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-01-17

The article was received 10.01.2024, accepted for publication 28.06.2024

азиатский подвид. Но позже, в 2012 г., оказалось, что штаммы этого подвида циркулируют в России. Эта неожиданная находка была крайне любопытной с точки зрения филогеографии туляремийного микроба и в то же время подняла ряд сугубо прикладных вопросов, таких как «эндемичен ли этот подвид для России, или же мы имеем дело со случайным или преднамеренным заносом штаммов из Средней Азии?», «насколько широко subsp. *mediasiatica* распространен в России?» и, наконец, «насколько этот подвид вирулентен, и насколько эффективна против него существующая вакцина?». В какой-то степени эти вопросы были освещены в ряде опубликованных после 2012 г. исследований. В данном обзоре приведено систематизированное описание биологии среднеазиатского подвида – его внутривидовой структуры, филогеографии, экологии и патогенного потенциала.

Распространение *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

Подвид *mediasiatica* первоначально был обнаружен в Средней Азии, в некоторых малонаселенных районах Казахстана и Туркмении. Именно ареал его распространения и послужил причиной названия этого подвида. Но начиная с 2011 г. штаммы этого подвида регулярно выделяются в Алтайском крае на территории России [2]. Чуть позже, в 2021 г., мы обнаружили штамм subsp. *mediasiatica* К-334 в Красноярском крае примерно в 500 км от Алтайского очага и >1500 км от среднеазиатских очагов [3].

Кроме того, один штамм subsp. *mediasiatica* 60(Б)57 был выделен в Каракалпакии (Узбекистан) [2], т.е. хоть и в

Средней Азии, но за пределами «классического» ареала. Также есть данные о том, что штамм *F. tularensis*, выделенный в Иране, возможно, также относится к подвиду *mediasiatica* [4]. Но, к сожалению, авторы не проводили подвидовую идентификацию описываемого ими изолята и обосновали свое мнение только относительной географической близостью Средней Азии и Ирана. Но, даже без учета иранского штамма, ареал распространения subsp. *mediasiatica* оказывается: 1) значительно шире, чем считалось до недавнего времени; 2) представлен двумя основными непересекающимися субареалами – алтайским и среднеазиатским (рис. 1).

Генетическое разнообразие *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

Филогенетический анализ панели штаммов подвида *mediasiatica* различного географического происхождения, основанный на анализе множественных VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) локусов (Multiple Loci VNTR Analysis/MLVA), проведенный по схеме, предложенной в работах [2] и [5], позволил разделить подвид на три подгруппы: М.I – классические среднеазиатские штаммы, М.II – алтайские штаммы и М.III, представленные одним штаммом 60(Б)57 (рис. 2).

Позже были опубликованы результаты филогенетического анализа на основе SNP (Single Nucleotide Polymorphism) несколько большей выборки штаммов, обнаруженных при полногеномном секвенировании. Полногеномный SNP-



Рис. 1. Примерные границы ареалов распространения *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*: А – Средняя Азия; В – Алтай; С – Каракалпакия; D – Каратузский район Красноярского края. Рисунок приведен по [2] с изменениями.

Fig. 1. Approximate boundaries of the distribution areas of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*: A – Central Asia; B – Altai; C – Karakalpakstan; D – Karatuzsky district of the Krasnoyarsk Territory. The figure is based on [2] with modifications.

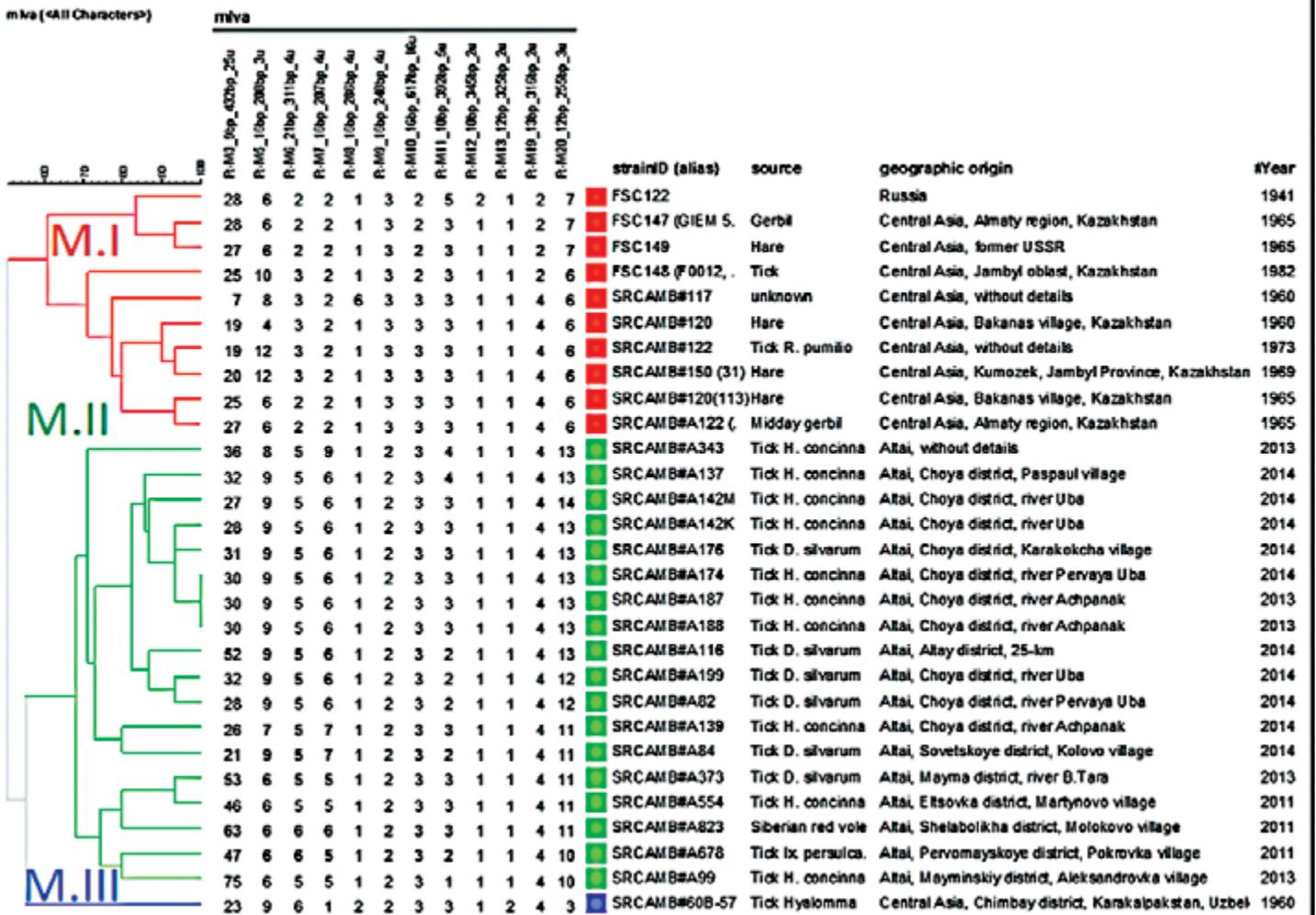


Рис. 2. Кластеризация штаммов подвида *mediasiatica* различного географического происхождения, основанная на MLVA-15, рисунок приведен по [6].
 Fig. 2. Clustering of strains of the subspecies *mediasiatica* of different geographical origins based on MLVA-15, figure adapted from [6].

анализ подтвердил внутривидовое деление на группы M.I, M.II и M.III (рис. 3). Таким образом, и MLVA-, и SNP-анализы показали, что недавно обнаруженная алтайская популяция генетически сепарирована от среднеазиатской и, вероятней всего, является эндемичной для региона. Кроме того, штамм, выделенный в Красноярском крае, также оказался относящимся к алтайской группе и абсолютно для нее типичным.

Штамм, выделенный в Красноярском крае, находится всего в двух SNP от штаммов, выделенных в Алтайском крае. Филогенетическое положение штамма K-334 с высокой степенью вероятности указывает на то, что алтайская подгруппа может иметь гораздо более широкое распространение в Сибири. К сожалению, ограничение известного нам ареала распространения подгруппы M.II обусловлено тем, что только Алтайская противочумная станция проводит систематическую работу по сбору штаммов *F. tularensis* и отправке их в референс-центр по надзору за туляремией на базе ФБУН ГНЦ ПМБ для дальнейшего их изучения. В результате мы располагаем достаточной информацией о генетических особенностях штаммов *F. tularensis*, циркулирующих на Алтае, но сведения о штаммах, циркулирующих в сопредельных регионах, крайне фрагментарны.

Также можно кратко остановиться на штамме 60(B)57. Помимо специфических особенностей MLVA- и SNP-профилей, мы обнаружили, что этот штамм характеризуется другой организацией генома, иными словами, большим количеством инверсий и перемещений крупных участков хромосомы по сравнению с хромосомной последовательностью штаммов M.I и M.II (на момент составления этого обзора данные не опубликованы).

Патогенность *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

Если подвиды *tularensis* и *holarctica* считаются безусловно вирулентными для человека и животных, то в отношении вирулентности подвида *mediasiatica* получены противоречивые данные. С одной стороны, нам не известны случаи туляремии у людей, достоверно вызванной штаммами этого подвида, даже на территории активного очага на Алтае, где эти штаммы постоянно циркулируют. Более того, только несколько штаммов были выделены от мертвых животных. Это могло бы косвенно указывать на то, что этот подвид слабо вирулентен. Но, с другой стороны, при экспериментальном заражении мышей оказывается, что штаммы подвида *mediasiatica* столь же вирулентны, как и штаммы патогенных подвидов, и характеризуются таким же низким LD₅₀ –

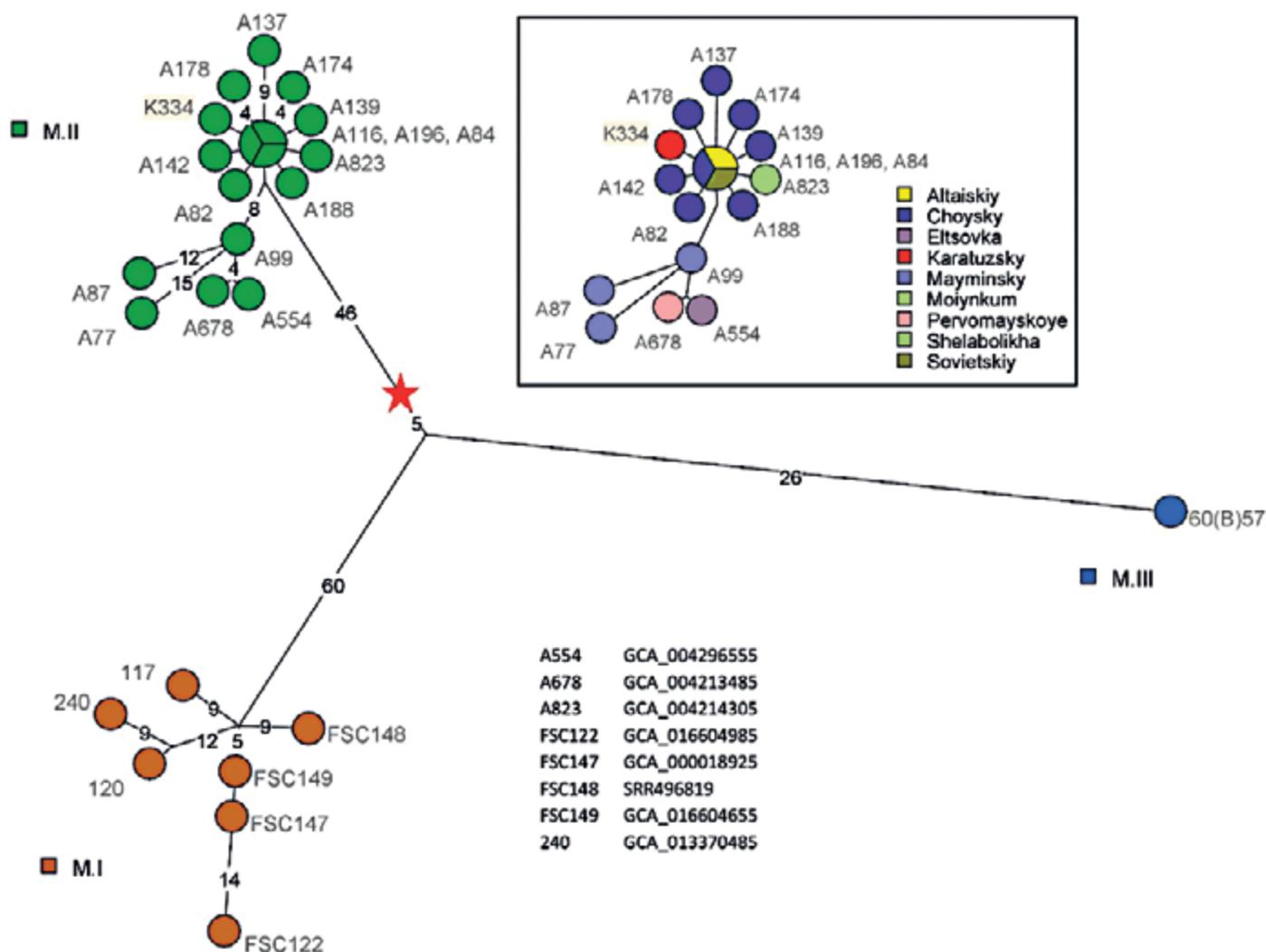


Рис. 3. Кластеризация штаммов подвида *mediasiatica* различного географического происхождения, основанная на данных полногеномного секвенирования. В верхней правой части рисунка изображено распределение генотипов группы M.II по географическому району выделения на Алтае и Красноярском крае. Числами обозначена генетическая дистанция. Звездочкой обозначено положение предполагаемого последнего общего предка всего подвида. Рисунок приведен по [3].

Fig. 3. Clustering of strains of the subspecies *mediasiatica* of different geographical origins, based on whole-genome sequencing data. The upper right part of the figure shows the distribution of genotypes of group M.II according to the geographical area of isolation in Altai and the Krasnoyarsk Territory. The numbers indicate genetic distance. The asterisk indicates the position of the putative last common ancestor of the entire subspecies. The figure is given from [3].

<10 КОЕ для невакцинированных мышей. Единственным исключением является штамм 60(Б)57, который абсолютно авирулентен по причине однонуклеотидной мутации, видимо, нарушающей экспрессию генов так называемого островка патогенности (данные получены авторами этой статьи в текущих исследованиях и на момент оформления этого обзора не опубликованы).

Из-за крайне низкого значения LD₅₀ для мышей при подкожном заражении сравнить вирулентность подвидов туляремийного микроба на мышинной модели напрямую не представляется возможным. Однако такое сравнение можно осуществить, используя предварительно вакцинированных животных. Так, ранее было показано, что по вирулентности для мышей BALB/c, подкожно иммунизированных живой туляремийной вакциной 15НИИЭГ за 21 день до заражения вирулентными штаммами, подвид *mediasiatica* сравним с подвидом *tularensis*, при этом они достоверно более вирулентны, чем подвид *holarctica*, который в данном опыте ока-

злся не способен преодолеть поствакцинальный иммунитет [2]. В другой работе были проведены более подробные исследования способности штаммов разных подвидов преодолевать поствакцинальный иммунитет у мышей и морских свинок при временном интервале вакцинация-заражение до 180 дней [7]. Согласно полученным результатам подвид *mediasiatica* оказался патогеннее подвида *holarctica* для беспородных мышей. Заражающий штамм *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 678 был способен преодолеть поствакцинальный иммунитет в более ранние сроки, а процент гибели вакцинированных животных достоверно превышал аналогичный показатель для *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 (рис. 4). На модели вакцинированных морских свинок подтвердить повышенную вирулентность среднеазиатского подвида не удалось – животные были полностью защищены от заражения штаммами подвидов *holarctica* и *mediasiatica* в течение всего эксперимента, в то время как штамм подвида *tularensis* начиная с 60-го дня после вакцинации вызывал

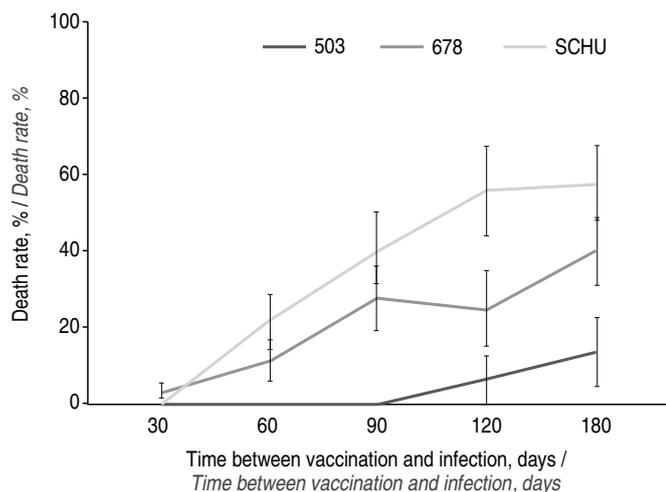


Рис. 4. Динамика роста показателя смертности с увеличением интервала между подкожной иммунизацией мышей BALB/c штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ и последующим подкожным заражением их вирулентными штаммами *F. tularensis*: subsp. *holarctica* 503, subsp. *mediasiatica* 678 и subsp. *tularensis* SCHU. Рисунок приведен по [2].

Fig. 4. Dynamics of growth in the mortality rate with increasing interval between subcutaneous immunization of BALB/c mice with *F. tularensis* strain 15NIEG and subsequent subcutaneous infection with virulent strains of *F. tularensis*: subsp. *holarctica* 503, subsp. *mediasiatica* 678 and subsp. *tularensis* SCHU. The figure is based on [2].

полную гибель всей группы. Обобщая эти данные, три подвида туляремийного микроба можно ранжировать от менее вирулентного к более вирулентному так: *holarctica* → *mediasiatica* → *tularensis*.

Экология *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

Высокая вирулентность штаммов подвида *mediasiatica*, определяемая экспериментально, как мы указали выше, вступает в некое противоречие с тем, что зафиксированы только единичные случаи инфицирования этими штаммами животных в природе и не зафиксировано ни одного случая инфицирования ими людей.

Наиболее простым объяснением этого противоречия является следующее. В эндемичных для подвида *mediasiatica* регионах, в частности на Алтае и в Сибири, крайне низкая плотность населения, неразвитая инфраструктура за пределами крупных городов и сильно пересеченная местность в совокупности приводят к тому, что санитарно-эпидемиологический надзор может быть весьма затруднительным. В результате, несмотря на то, что штаммы *F. tularensis* циркулируют в регионе, зачастую неизвестно, к какому подвиду они принадлежат. Более того, в таких условиях случаи нелетального заболевания человека, в том числе туляремией, могут остаться без внимания врачей и ученых. В рамках концепции «недостаточного эпиднадзора» почти полное отсутствие случаев выделения штаммов подвида *mediasiatica* от животных можно объяснить высокой патогенностью этого подвида – заразившееся животное умирает быстрее, чем при заражении штаммом subsp. *holarctica*, и, следовательно, имеет меньше шансов попасть в ловушку, а штамм, следовательно, имеет меньше шансов быть выделенным.

Для изложения альтернативной гипотезы (более подробно описанной в [8]) нам необходимо снова обратить внимание на тот факт, что абсолютное большинство штаммов subsp. *mediasiatica* M.II были выделены из клещей *Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor silvarum*. Более того, интересно, что территория, на которой эти штаммы циркулируют, представляет собой пересечение ареалов распространения этих двух видов клещей [6]. Можно предположить, что subsp. *mediasiatica* M.II циркулирует преимущественно как эндосимбионт этих клещей, распространяясь как некоторые другие патогены, переносимые клещами горизонтально за счет гиперпаразитизма [6] и орально-анального контакта [9] и/или вертикально при трансвариальной передаче патогенов [10] от самок клещей к потомству. При этом при укусе клеща возбудитель просто не передается теплокровному хозяину или передается в отдельных редких случаях, т.е., согласно описываемой гипотезе, существуют некоторые особенности во взаимодействии клещей с бактериями subsp. *mediasiatica* M.II, предотвращающие попадание возбудителя в рану при укусе. Например, таким механизмом могли бы быть специфические особенности колонизации тела клеща, при которых патоген колонизирует не слюнные железы и ротовой аппарат в целом, а какие-либо другие ткани и органы. Обобщая вышесказанное, можно предположить, что бактерии subsp. *mediasiatica*, обладая полным набором факторов, позволяющих эффективно размножаться в теле теплокровного хозяина и вызывать тяжелую инфекцию, не выработали или, наоборот, утратили ряд приспособлений, позволяющих в естественных условиях попадать в организм этого хозяина.

Заключение

Несмотря на значительный прогресс в изучении среднеазиатского подвида туляремийного микроба, которого удалось достичь в последнее десятилетие, это подвид остается наименее изученным. К настоящему времени мы не представляем себе в полной мере ни его патогенного потенциала, ни особенностей его циркуляции в природных экосистемах, ни даже ареала его распространения. Учитывая, что *F. tularensis* является особо опасным патогеном, отнесенным ко II группе опасности, без этих данных не представляется возможным проведение эффективного планирования профилактических и экстренных противоэпидемических мер. Мы надеемся, что дальнейшие исследования биологии *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* не только помогут решению этих сугубо прикладных вопросов, но и позволят пролить свет на теоретические вопросы реконструкции эволюции и филогеографии вида *F. tularensis* и семейства *Francisellaceae* в целом.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific 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. Telford SR 3rd, Goethert HK. Ecology of *Francisella tularensis*. Annu Rev Entomol. 2020 Jan 7;65:351-372. DOI: 10.1146/annurev-ento-011019-025134
2. Timofeev V, Bakhteeva I, Titareva G, Kopylov P, Christiany D, Mokrievich A, et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. PLoS One. 2017;12(9):e0183714. DOI: 10.1371/journal.pone.0183714
3. 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;1:242-249. DOI: 10.3390/bacteria1040018
4. Mostafavi E, Ghasemi A, Rohani M, Molaiepoor L, Esmaeili S, Mohammadi Z, et al. Molecular Survey of Tularemia and Plague in Small Mammals From Iran. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jul 10;8:215. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00215
5. Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J Bacteriol. 2004 Sep;186(17):5808-18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004
6. Buczek A, Bartosik K, Buczek AM, Buczek W, Stanko M. Conspecific hyperparasitism in the *Hyalomma excavatum* tick and considerations on the biological and epidemiological implications of this phenomenon. Ann Agric Environ Med. 2019;26(4):548-54. DOI: 10.26444/aaem/110128
7. Timofeev V, Titareva G, Bahtejeva I, Kombarova T, Kravchenko T, Mokrievich A, et al. The Comparative Virulence of *Francisella tularensis* Subsp. *mediasiatica* for Vaccinated Laboratory Animals. Microorganisms. 2020 Sep 12;8(9):1403. DOI: 10.3390/microorganisms8091403

8. Rubel F, Brugger K, Belova OA, Kholodilov IS, Didyk YM, Kurzrock L, et al. Vectors of disease at the northern distribution limit of the genus *Dermacentor* in Eurasia: *D. reticulatus* and *D. silvarum*. Exp Appl Acarol. 2020 Sep;82(1):95-123. DOI: 10.1007/s10493-020-00533-y
9. Buczek A, Bartosik K, Buczek W, Buczek AM, Kulina D, Kulisz J, et al. A unique phenomenon of oral-anal contact between ticks observed in two tick species *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. Ann Agric Environ Med. 2018 Dec 20;25(4):686-689. DOI: 10.26444/aaem/99054
10. Hasle G. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Sep 10;3:48. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00048

Информация о соавторах:

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских 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, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Тимоев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Irina V. Bakhteeva, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

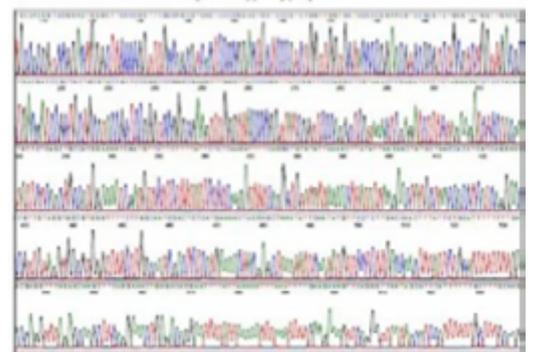
Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Major Researcher of Micro-Biology of Anthrax of the Department of Especially Dangerous Infections, State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Vitaly S. Timofeev, PhD (Biological Sciences), Major Researcher of Micro-Biology of Anthrax of the Department of Especially Dangerous Infections, State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Что такое mEnrich-seq?

Метагеномика позволила всесторонне изучить микробиомы. Тем не менее, многие приложения выиграют от метода, который секвенирует конкретные бактериальные таксоны, представляющие интерес, но не большинство фоновых таксонов. Разработан mEnrich-seq (где «m» означает метилирование, а seq – секвенирование) для обогащения представляющих интерес таксонов из метагеномной ДНК перед секвенированием. Основная идея состоит в том, чтобы использовать дифференциацию «свой» и «чужой» посредством естественного метилирования бактериальной ДНК и рационально выбирать чувствительные к метилированию рестриктазы, индивидуально или в комбинации, для истощения таксонов-хозяев и фоновых таксонов при одновременном обогащении целевых таксонов. Эта идея интегрирована с процедурами подготовки библиотеки и применяется в нескольких приложениях для обогащения (до 117 раз) патогенных или полезных бактерий из образцов мочи и фекалий человека, включая виды, которые трудно культивировать или которые имеют низкую численность. На данный момент мы оценили 4601 бактериальный штамм с картированными метиломами и показали широкую применимость mEnrich-seq. mEnrich-seq предоставляет исследователям микробиома универсальный и экономически эффективный подход для селективного секвенирования различных представляющих интерес таксонов.



Cao L, Kong Y, Fan Y, Ni M, Tourancheau A, Ksiezarek M, et al.
mEnrich-seq: methylation-guided enrichment sequencing of bacterial taxa of interest from microbiome.
Nat Methods. 2024 Feb;21(2):236-246. DOI: 10.1038/s41592-023-02125-1

Особенности бактерий рода *Blautia* – представителей микробиоты толстой кишки

Н.Н.Кукалевская, Т.А.Бажукова, Н.В.Давидович, М.А.Сабанаев

ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет», Архангельск, Российская Федерация

Бактерии рода *Blautia* проявляют метаболическую активность в отношении сложного динамичного биоценоза постоянных и изменяющихся популяций микробиоты толстой кишки. Однако информация, имеющаяся на сегодняшний день в отношении данных представителей, разрознена и не структурирована. В связи с этим цель настоящего обзора – систематизировать и структурировать имеющиеся знания о бактериях рода *Blautia*. Проведен поиск публикаций 2010–2022 гг. в базах данных Pubmed и e-LIBRARY на русском и английском языках. Из 515 источников нами были отобраны 44, в которых была приведена информация относительно данного рода микроорганизмов. В статье дана характеристика рода *Blautia*, а также некоторых ее видов: *B. luti*, *B. wexlerae*. Обобщена информация о метаболической активности бактерий: утилизации углеводов, а также участии в процессах биотрансформации и других субстратных обменах. Уточнены и описаны механизмы влияния *Blautia* на здоровье организма хозяина, отражено распределение бактериальных сообществ в зависимости от типа питания, географии, возраста. Отмечено, что бактерии рода *Blautia* играют роль в возникновении воспалительных заболеваний и других патологий, однако некоторые виды обладают пробиотическим потенциалом. Таким образом, изучение данного рода бактерий является актуальным для всестороннего понимания их функций в организме хозяина и решения вопроса о пробиотическом потенциале.

Ключевые слова: *Blautia luti*, *Blautia wexlerae*, толстая кишка, микробиота, кишечник, пробиотический потенциал

Для цитирования: Кукалевская Н.Н., Бажукова Т.А., Давидович Н.В., Сабанаев М.А. Особенности бактерий рода *Blautia* – представителей микробиоты толстой кишки. Бактериология. 2024; 9(2): 81–88. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-81-88

Features of bacteria of the genus *Blautia* – representatives of the microbiota of the colon

N.N.Kukalevskaya, T.A.Bazhukova, N.V.Davidovich, M.A.Sabanaev

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation

Bacteria of the genus *Blautia* are representative of the colon microbiota. However, to date, there is little information known about this genus, while many studies are being carried out to study this bacteria, their functional and metabolic activity, and its effect on the host organism. The goal is to systematize and structure the existing knowledge about *Blautia*. Searched for publications 2010–2022 in the Pubmed and e-LIBRARY databases in Russian and English. From 515 sources, we selected 44, which provided information on this genus of microorganisms. The article describes the characteristics of the genus *Blautia*, including some species. Information about the utilization of carbohydrates, the dependence of its distribution on diet, geography, and age is described. Known mechanisms of influence of *Blautia* on the health of the host organism are uncovered. It is indicated which substrates are capable of biotransformation bacteria of this genus and what products are formed in this case. There is no doubt that bacteria of the genus *Blautia* play a role in the occurrence of inflammatory diseases and other pathologies. At the same time, it is not necessary to generalize equally positive or negative effect to all species of this genus. To date, the study of this genus of bacteria is relevant for a comprehensive understanding of its functions in the host organism and for resolving the issue of a possible probiotic potential.

Key words: *Blautia luti*, *Blautia wexlerae*, colon, microbiota, intestines, probiotic potential

For citation: Kukalevskaya N.N., Bazhukova T.A., Davidovich N.V., Sabanaev M.A. Features of bacteria of the genus *Blautia* – representatives of the microbiota of the colon. Bacteriology. 2024; 9(2): 81–88. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-81-88

Микробиота человека – сообщество микроорганизмов, включающее бактерии, грибы, вирусы и археи. Большая часть микробиоты кишечника представлена бактериями [1]. Согласно результатам исследований секвенирования 16S рНК, *Bacillota* (ранее *Firmicutes*) является одним из основных типов кишечной микробиоты человека и других

позвоночных, а семейство *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* составляют 50 и 30% от общей массы микроорганизмов соответственно [2].

Blautia, как представитель рода семейства *Lachnospiraceae*, особенно интересна для исследователей ввиду ее роли в развитии воспалительных и метаболических заболе-

Для корреспонденции:

Кукалевская Наталья Николаевна, ассистент кафедры клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет»

Адрес: 163000, Архангельск, Троицкий пр-т, 180

Телефон: (81822) 28-5765

ORCID: 0000-0003-3371-1485

Статья поступила 14.09.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Natalya N. Kukalevskaya, Assistant of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics, Northern State Medical University

Address: 180 Troitsky ave., Arkhangelsk, 163000, Russian Federation

Phone: (81822) 28-5765

ORCID: 0000-0003-3371-1485

The article was received 14.09.2023, accepted for publication 28.06.2024

ваний, а также антибактериальной активности против некоторых видов микроорганизмов [3].

В ряде исследований показано, что состав и изменения популяции *Blautia* в кишечнике связаны с возрастом хозяина, географией, характером питания, генотипом, состоянием здоровья и другими физиологическими особенностями. Было обнаружено, что этот род играет определенную роль в биотрансформации и взаимодействии с другими кишечными микроорганизмами – *Ruminococcus*, *Akkermansia*, *Roseburia*, *Prevotella* [4]. Несмотря на то, что *Blautia* показала ряд потенциальных пробиотических свойств, до сих пор нет всестороннего понимания этого рода бактерий, вероятно, из-за отсутствия полной филогенетической, метаболической, функциональной и других характеристик. 9-е издание Руководства Берджи по систематической бактериологии не содержит описания рода *Blautia*, только некоторые филогенетические характеристики некоторых «предыдущих» видов, принадлежащих к роду *Clostridium* или *Ruminococcus*, и краткое описание характеристик штаммов [5].

В связи с этим целью работы явились систематизация и структурирование имеющихся знаний о *Blautia*. Проведен поиск публикаций 2010–2022 гг. в базах данных Pubmed и e-LIBRARY на русском и английском языках. Из 515 источников нами были отобраны 44, в которых была приведена информация относительно данного рода микроорганизмов. В этой статье рассматриваются исследования, касающиеся *Blautia*, и обсуждается потенциальный пробиотический потенциал данных бактерий.

Характеристики

Разнообразие видов

С помощью филогенетического анализа последовательностей генов 16S рПНК в сочетании с культуральным анализом установлено, что на сегодняшний день род *Blautia* составляют около 30 видов, включая *B. coccoides*, *B. hansenii*, *B. producta* [6]. Филогенетическое дерево этого рода постоянно обновляется по мере добавления новых видов и штаммов, но в целом виды рода *Blautia* по-прежнему образуют относительно стабильную и последовательную однолинейную ветвь [7].

Наиболее распространенными видами *Blautia* spp., выделенными из микробиоты кишечника, в т.ч. в детском возрасте, являются *B. wexlerae* и *B. luti*, тогда как в состав микробиоты верхних дыхательных путей входила *B. producta*, выделенная из мокроты [8].

Характеристика бактерии

Бактериальные клетки *Blautia* обычно сферической или овальной формы, располагаются парами или в виде нитей, не имеют жгутиков, большинство штаммов не имеют спор. По типу дыхания данные бактерии относятся к строгим анаэробам. Для большинства штаммов *Blautia* температурный оптимум составляет 37°C, pH 7,0 [6]. Некоторые виды, такие как *B. producta*, обладают как гетеротрофными, так и автотрофными свойствами и могут использовать CO, H₂/CO₂ и углеводы в качестве источников энергии (табл. 1) [7].

Длинноцепочечные жирные кислоты, продуцируемые штаммами *Blautia*, подразделяются на насыщенные и мононенасыщенные, основными видами являются C14:0, C16:0 и C16:0DMA – диметилацетиленовые жирные кислоты [6].

Зависимость от возраста, питания и географии

Питание

Рацион питания является основополагающим фактором, влияющим на состав и характеристику микробиоты [9]. Так, добавление пищевых волокон, извлеченных из кукурузы (F-FOPs), в рацион мышей, получающих высокое содержание жиров с пищей (HF), значительно увеличивало содержание *Blautia* в мышинных фекалиях [10]. Такой же феномен также наблюдался у здоровых взрослых собак, рацион которых был дополнен картофельной клетчаткой [11]. В одном исследовании доброволец мужского пола потреблял 600 мг ω-3 ежедневно в течение 14 дней, в результате общее микробное разнообразие кишечника уменьшилось, снизилось количество *Faecalibacterium*, но значительно увеличилось содержание *Blautia* [12].

Возраст

Возраст – еще один фактор, влияющий на видовое многообразие микробиоты кишечника. В ходе исследования A.Endo et al. по оценке микробиоты кишечника у детей в возрасте от 2 нед. до 13 лет было выявлено, что *B. coccoides* редко присутствовала в кишечной микробиоте детей младше 6 мес., но чаще встречалась у детей старше 1 года [13]. Перекрестное исследование фекалий 367 здоровых японцев в возрасте 0–104 лет показало, что кишечная микробиота взрослых японцев (21–69 лет) содержала большое количество *Blautia* и *Bifidobacterium* и мало *Bacteroides*. Кроме того, по сравнению со взрослыми у пожилых людей наблюдалось снижение биоразнообразия микробиома, в т.ч. снижение *Blautia*. Эта особенность может быть связана с возрастным

Таблица 1. Характеристика утилизации углеводов у разных штаммов
 Table 1. Characteristics of carbohydrate utilization in different strains

Штамм / Strain	<i>Blautia coccoides</i>	<i>Blautia hansenii</i>	<i>Blautia luti</i>	<i>Blautia producta</i>	<i>Blautia wexlerae</i>
Конечные продукты / Final products	A, C	Л, A	A, C	Л, A	A, C
Глюкоза / Glucose	+	+	+	+	+
Ксилоза / Xylose	+	-	+	+	+
Сахароза / Sucrose	+	-	+	+	+/-
Фруктоза / Fructose	+	-	+	+	+/-
Лактоза / Lactose	+	+	+	+	+/-
Рафиноза / Raffinose	+	+	+	+	+/-

A – ацетат; C – сукцинат; Л – лактат. / A – acetate; C – succinate; Л – lactate.

физиологическим угнетением иммунной функции, сопровождающимся наличием хронического воспаления [14].

География

Некоторые исследования указывают на зависимость состава кишечной микробиоты от географического района проживания и высоты над уровнем моря. В ходе изучения характеристик микробного сообщества в фекалиях 303 детей школьного возраста из городских или сельских районов пяти стран, находящихся в умеренных и тропических регионах Азии, было выявлено, что кишечная микробиота детей была разделена на две группы: *Prevotella* (тип Р) и *Bifidobacterium/Bacteroides* (тип ВВ). Кишечная микробиота детей в Китае, Японии, Тайване и других регионах с умеренным климатом была в основном ВВ-типа, тогда как у детей в Таиланде, Индонезии и других тропических странах – Р-типа. Примечательно, что высокое содержание *Blautia* было характерно для людей с кишечной микробиотой ВВ-типа, составляя 10% от общего бактериального состава ВВ-типа, но только 5% от общего бактериального состава Р-типа [15].

Секвенирование образцов фекальной микробиоты 208 тибетцев из 6 регионов на основе анализа операционных таксономических единиц показало, что представители рода *Blautia* доминировали в микробиоте кишечника всех обследованных и их содержание менялось с увеличением высоты над уровнем моря, индекса массы тела и возраста; в частности, увеличилось содержание факультативных анаэробов [16]. Другое исследование показало, что преобладающими кишечными родами у японцев являются *Bifidobacterium* и *Clostridium*, а у американцев, китайцев, французов и испанцев – *Bacteroides*, у австралийцев – *Blautia* [17]. Вероятно, различия в микробном биоразнообразии кишечника человека в зависимости от географического местоположения в значительной степени связаны с наследственностью, образом жизни и особенностями питания [18].

Физиологические функции

Биотрансформация биоактивных веществ

Бактерии рода *Prevotella* и *Xylanibacter* могут разлагать такие компоненты пищи, как целлюлоза и ксилан, которые не перевариваются организмом хозяина. В результате повышается содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в фекалиях, улучшается переваривание пищи [19]. В последние годы исследователей привлекает изучение биотрансформации и метаболизма травяных растений и функциональных пищевых продуктов с помощью *Blautia*. Исследования показали, что штамм *Blautia* spp. MRG-PMF1 оказывает гидролитическое действие на функциональные группы арилметилового эфира в 5,7-диметоксифлавоне (5,7-ДМФ) и 5,7,4-триметоксифлавоне (5,7,4-ТМФ). Полиметоксифлавоны представляют собой флавоноиды, выделенные из *Kaempferia* и цитрусовых, обладающие противораковыми, противовоспалительными, противовирусными и антикоагулянтными свойствами [20]. Штамм *Blautia* spp. MRG-PMF1 также обладает способностью к дегликозилированию, вследствие чего может метаболизировать изофлавоны, флавоны и флавоноиды в соответствующие агликоны. В ходе превращения флавоноидов реакции, катализируемые *Blautia*, включают деметилирование, дегидроксилирование,

Таблица 2. Биотрансформация биоактивных веществ
 Table 2. Biotransformation of bioactive substances

Субстрат / Substrate	Штамм / Strain	Продукт биотрансформации / Product of biotransformation
5,7-ДМФ / 5,7-DMF 5,7,4-ТМФ / 5,7,4-TMF	<i>Blautia</i> spp. MRG-PMF1	Хризин / Chrysin Апигенин / Apigenin
Икариин / Icaritin		Десметиликаритин, гидролизаты икарина / <i>Desmethylicaritin, icarin hydrolysates</i>
Куркумин / Curcumin		Деметилкуркумин, бисдескуркумин / <i>Demethylcurcumin, bisdescurcumin</i>
Глюкозилцерамид / <i>Glucosylceramide</i>	<i>Blautia glucerasei</i> spp. nov. HFTH-1 T	Функциональные вещества со специфическим профилактическим действием против рака толстой кишки / <i>Functional substances with specific preventive effects against colon cancer</i>
ДМФ – диметоксифлавоны, ТМФ – триметоксифлавоны. / DMF – dimethoxyflavone, TMF – trimethoxyflavone.		

О- и С-дегликозилирование и расщепление С-кольца. Также исследователи обнаружили, что *Blautia* spp. MRG-PMF1 может биотрансформировать икариин и куркумин в анаэробных условиях (табл. 2) [21].

Диметилкуркумин, по сравнению с куркумином, обладает высоким антиканцерогенным потенциалом в отношении НСТ116 рака толстой кишки, в то время как синтетический диметилкуркумин обладает нейропротекторным и противовоспалительным действием [22]. В то же время *Blautia glucerasei* spp. nov. HFTH-1 T продуцирует специфический внеклеточный фермент, который гидролизует глюкозилцерамид в функциональные вещества со специфическим профилактическим действием против рака толстой кишки [23].

Следует отметить, что некоторые виды биотрансформации с участием *Blautia* имеют потенциально негативные свойства. Так, некоторые виды *Blautia* могут осуществлять 7- α -дегидроксилирование первичных желчных кислот и преобразовывать их во вторичные желчные кислоты, такие как литохолевая и дезоксихолевая. Их содержание коррелирует с развитием рака толстой кишки, и их обнаруживают в более высоких концентрациях в фекалиях пациентов с язвенным колитом, дисплазией или злокачественным новообразованием [24].

Blautia также участвует в процессах дегликозилирования полифенолов и катаболизма лигнанов. В целом бактериальный метаболизм в кишечнике включает восстановление и гидролиз, в результате чего образуются неполярные низкомолекулярные продукты [25]. Исследование биотрансформации *Blautia* имеет важное значение для разработки новых ферментов и биоактивных метаболитов для пищевых добавок и обеспечивает ценную перспективу для дальнейших исследований кишечного микробиома человека [26, 27].

Связь со вторичными метаболитами

Вторичные метаболиты представляют собой биологически активные соединения, продуцируемые микроорганизма-

Таблица 3. Типы бактерицидов, продуцируемых *Blautia*
 Table 3. Types of bactericides produced by *Blautia*

Штамм / Strain	Бактериоцины/ Bacteriocins
<i>B. schinkii</i> DSM 10518	Имеет кластер генов, кодирующий сактипептид [30] / Has a gene cluster encoding sactipeptide [30]
<i>Blautia</i> sp. SF-50	Имеет кластер генов, кодирующий сактипептид и лантипептид [31] / Has a gene cluster encoding sactipeptide and lantipeptide [31]
<i>B. obeum</i> A2-162	Содержит новый лантибиотик – низин О, который показал антибактериальную активность в отношении <i>Clostridium perfringens</i> [32] / Contains a new lantibiotic – nisin O, which has shown antibacterial activity against <i>Clostridium perfringens</i> [32]
<i>B. producta</i>	Ингибирует рост устойчивых к ванкомицину энтерококков (VRE), секретируя лантибиотик, аналогичный низину-А, который оказывает бактериостатическое действие [32] / Inhibits the growth of vancomycin-resistant enterococci (VRE) by secreting a lantibiotic similar to nisin-A, which has a bacteriostatic effect [32]

ми в процессе роста и жизнедеятельности, которые широко используются в антибактериальных, противоопухолевых препаратах, гербицидах и инсектицидах [28].

Одной из особенностей *Blautia* является ее антибактериальная активность, связанная с синтезом бактериоцинов. При изучении вторичных метаболитов у 74 штаммов *Blautia* был выявлен 261 кластер генов вторичного метаболического биосинтеза, включающих нерибосомальные пептиды, сактипептид, лантипептид, бактериоцин, лассопептид, бета-лактон (табл. 3). Нерибосомальные пептиды и поликетиды – вторичные метаболиты с широким спектром свойств: сидерофоры, участвующие в очистке железа, пигменты, которые обеспечивают защиту от множества факторов стресса, а также усвоение питательных веществ, химическую коммуникацию и защитные реакции [29].

Виды *B. obeum* и *B. producta* могут ингибировать пролиферацию *C. perfringens* и ванкомицин-резистентных энтерококков, что свидетельствует об их пробиотических функциях.

Связь с метаболическим синдромом

В последние десятилетия во всем мире резко возросла распространенность метаболических заболеваний, связанных с ожирением, таких как сахарный диабет 2-го типа (СД2), что, в свою очередь, привело к повышению распространенности атеросклероза, неалкогольной жировой болезни печени и некоторых видов рака. Недавние исследования показали, что кишечная микробиота играет важную роль в ожирении и связанных с ним заболеваниях [33]. Было обнаружено, что *Blautia* является единственным родом, который показал выраженную отрицательную связь с накоплением висцерального жира у японцев, независимо от пола [34]. В другом исследовании у детей с ожирением было обнаружено более высокое содержание *Bacteroides* и более низкое содержание *Firmicutes* в кишечнике, что сопровождалось снижением содержания *Blautia* и *Faecalibacterium*. Другие ученые выявили, что количество *Blautia* значительно уменьшилось у детей с диабетом по сравнению со здоровыми детьми [35]. *Blautia* является продуцентом уксусной кислоты в кишечнике, которая может ингибировать передачу сигналов инсулина и накопление жира в адипоцитах путем активации рецепторов, связанных с G-белком GPR41 и GPR43.

Это способствует метаболизму несвязанных липидов и глюкозы в других тканях и, таким образом, облегчает течение заболеваний, связанных с ожирением [36]. Поперечное исследование показало, что *Blautia*, особенно *B. luti* и *B. wexlerae*, помогают уменьшить воспаление, связанное с ожирением. Таким образом, эти результаты могут служить базой для основанных на микробиоте стратегий ранней профилактики ожирения и его осложнений в будущем [37].

Также в недавних исследованиях было показано, что у детей при СД2 содержание бактерий *Blautia* и отношение *Firmicutes/Bacteroidetes* положительно коррелировали с уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c). Некоторые авторы сообщали, что число *Blautia* положительно коррелировало и с количеством аутоантител. Следовательно, бактерии *Blautia* могут влиять на развитие СД2 посредством регуляции иммунного ответа [38].

Связь с преэклампсией

На сегодняшний день были опубликованы результаты первого исследования, в котором изучался состав кишечной микробиоты у женщин с преэклампсией (ПЭ), в котором были проанализированы образцы кала во время беременности, через 1 и 6 нед. после родов. Результаты показали ряд интересных особенностей: были выделены 13 ПЭ-ассоциированных бактериальных видов, центральная роль в патологическом микробиоме кишечника при ПЭ принадлежала *Blautia* и *Ruminococcus* [39].

Связь с воспалением

Blautia, как род комменсальных облигатных анаэробных бактерий, играет важную роль в поддержании экологического баланса в кишечнике и предотвращении воспаления путем активизации кишечных регуляторных Т-клеток и продукции КЦЖК [40].

Число воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), включая болезнь Крона и язвенный колит, в последние десятилетия увеличивается во многих развивающихся странах, число которых в последние десятилетия увеличивается во многих развивающихся странах [41]. Анализ микробиоты фекалий и слизистых оболочек у больных ВЗК и здоровых людей показал, что количество *Blautia* значительно снижено в микробиоте слизистой оболочки слепой кишки у пациентов с болезнью Крона [38]. Аналогичный факт был также зарегистрирован в микробиоте слизистых оболочек пациентов с колоректальным раком [42]. Также было показано, что *Blautia* и *Faecalibacterium prausnitzii* составляют меньшую долю в микробиоте, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника, у больных спорадическим раком по сравнению со здоровыми людьми, но их много во внеопухолевой микросреде [43]. Имеются данные о распространенности *Blautia* у пациентов с ранним раком молочной железы [44]. Большинство представленных исследований были сосредоточены на уровне бактериального рода и не проводили углубленного изучения на уровне видов или штаммов, в связи с этим необходимо продолжить оценку свойств бактерий *Blautia* на уровне видов и штаммов при различных физиологических и патологических состояниях для возможности оценки благотворного или неблагоприятного воздействия на здоровье человека.

Воздействие других бактерий на представителей рода *Blautia*

Перекрестное питание *Blautia*, как рода анаэробных бактерий, с другими бактериями также в некоторой степени способствует регуляции метаболизма. Исследование J.A.Laverde Gomez et al. показало, что при использовании 0,2%-го резистентного крахмала в качестве источника энергии *Ruminococcus bromii* производит муравьиную кислоту, этанол и уксусную кислоту примерно в равных молярных соотношениях на среде RUM-RS [4]. Однако периодическое совместное культивирование с ацетогенными бактериями *B. hydronotrophica* на крахмале приводило к исчезновению муравьиной кислоты при повышении уровня уксусной кислоты. Секвенирование РНК использовалось для дальнейшего изучения межвидовых взаимодействий для обнаружения экспрессии генов в непрерывных совместных культурах *R. bromii* и *B. hydronotrophica*. Анализ транскриптома выявил повышенную регуляцию генов *B. hydronotrophica*, участвующих в пути Вуда–Льонгдаля, в дополнение к кластеру из 10 генов, ответственному за усиление ферментации аминокислот с разветвленной цепью в совместной культуре. Перекрестное питание между видами, продуцирующими муравьиную кислоту, и видами, продуцирующими уксусную кислоту, может играть важную роль в образовании КЦЖК в толстой кишке и способствовать массовому производству уксусной кислоты [4]. Будучи ключевым анаэробным микроорганизмом, *B. hydronotrophica* потребляет H_2 и CO_2 по пути Вуда–Льонгдаля с образованием уксусной кислоты. Этот путь активируется при сосуществовании с *Bifidobacterium bifidum*. *B. bifidum* служит особым видом, ферментирующим углеводы и производящим CO_2 , который является фиксированным субстратом в пути Вуда–Льонгдаля. Таким образом, изменения, наблюдаемые в пути Вуда–Льонгдаля у *B. hydronotrophica*, могут быть результатом перекрестного питания *B. bifidum* [45].

Заключение

Таким образом, являясь одним из доминирующих видов кишечной микробиоты, бактерии рода *Blautia* играют значительную роль в обмене веществ, воспалительных заболеваниях и биотрансформации. Большинство свойств этого рода ассоциированы с потенциальным пробиотическим эффектом, тогда как причинно-следственные связи между различным содержанием *Blautia* и метаболическими/воспалительными заболеваниями пока не до конца установлены. Количественное содержание бактерий по-разному коррелирует с различными патологическими состояниями (низкое содержание *Blautia* отмечается у людей, страдающих сахарным диабетом / ожирением, тогда как повышение содержания отмечается при ВЗК). Однако необходимо осуществлять мониторинг взаимосвязи метаболических, функциональных и иммунных эффектов *Blautia* на состояние макроорганизма не только на уровне бактериального рода, но и на видовом уровне и даже на уровне штаммов. На сегодняшний день выделено всего несколько штаммов *Blautia*, и в руководстве Берджи нет описания характеристик этого рода, а информация о геноме остается ограниченной. Таким образом, необходимо выделить, секвенировать и описать больше штаммов *Blautia* от различных хозяев, чтобы охарактеризовать

физиологические свойства этого рода и упорядочить их геномы. Учитывая роль *Blautia* в метаболизме хозяина, также остается актуальным вопрос об изучении ее пробиотического потенциала.

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 interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Miller AL, Bessho S, Grando K, Tükel Ç. Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Front Immunol*. 2021 Feb 26;12:638867. DOI: 10.3389/fimmu.2021.638867
2. Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in Diverse Gut Communities. *Diversity*. 2013;(5):627-640. DOI: 10.3390/d5030627
3. Kalyana Chakravarthy S, Jayasudha R, Sai Prashanthi G, Ali MH, Sharma S, Tyagi M, et al. Dysbiosis in the Gut Bacterial Microbiome of Patients with Uveitis, an Inflammatory Disease of the Eye. *Indian J Microbiol*. 2018 Dec;58(4):457-469. DOI: 10.1007/s12088-018-0746-9
4. Laverde Gomez JA, Mukhopadhyaya I, Duncan SH, Louis P, Shaw S, Collieduguid E, et al. Formate cross-feeding and cooperative metabolic interactions revealed by transcriptomics in co-cultures of acetogenic and amylolytic human colonic bacteria. *Environ Microbiol*. 2019 Jan;21(1):259-271. DOI: 10.1111/1462-2920.14454
5. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи. Том 2. М.: Мир, 1997;574-575.
6. Shin NR, Kang W, Tak EJ, Hyun DW, Kim PS, Kim HS, et al. *Blautia hominis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Apr;68(4):1059-1064. DOI: 10.1099/ijsem.0.002623
7. Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccooides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccooides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008 Aug;58(Pt 8):1896-902. DOI: 10.1099/ijms.0.65208-0
8. Touyama M, Jin JS, Kibe R, Hayashi H, Benno Y. Quantification of *Blautia wexlerae* and *Blautia luti* in human faeces by real-time PCR using specific primers. *Benef Microbes*. 2015;6(4):583-90. DOI: 10.3920/BM2014.0133
9. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):52-60. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.10.020
10. Yang J, Bindels LB, Segura Munoz RR, Martinez I, Walter J, Ramer-Tait AE, et al. Disparate Metabolic Responses in Mice Fed a High-Fat Diet Supplemented with Maize-Derived Non-Digestible Feruloylated Oligo- and Polysaccharides Are Linked to Changes in the Gut Microbiota. *PLoS One*. 2016 Jan 5;11(1):e0146144. DOI: 10.1371/journal.pone.0146144
11. Panasevich MR, Kerr KR, Dilger RN, Fahey GC Jr, Guérin-Deremaux L, Lynch GL, et al. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. *Br J Nutr*. 2015 Jan 14;113(1):125-33. DOI: 10.1017/S0007114514003274

12. Noriega BS, Sanchez-Gonzalez MA, Salyakina D, Coffman J. Understanding the Impact of Omega-3 Rich Diet on the Gut Microbiota. *Case Rep Med*. 2016;2016:3089303. DOI: 10.1155/2016/3089303
13. Endo A, Pärtty A, Kalliomäki M, Isolauri E, Salminen S. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. *Anaerobe*. 2014 Aug;28:149-56. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.06.006
14. Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res Rev*. 2017 May;35:36-45. DOI: 10.1016/j.arr.2017.01.001
15. Nakayama J, Watanabe K, Jiang J, Matsuda K, Chao SH, Haryono P, et al. Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep*. 2015 Feb 23;5:8397. DOI: 10.1038/srep08397
16. Lan D, Ji W, Lin B, Chen Y, Huang C, Xiong X, et al. Correlations between gut microbiota community structures of Tibetans and geography. *Sci Rep*. 2017 Dec 5;7(1):16982. DOI: 10.1038/s41598-017-17194-4
17. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol*. 2017 Jun 23;8:1162. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01162
18. Zhang J, Guo Z, Xue Z, Sun Z, Zhang M, Wang L, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *ISME J*. 2015 Sep;9(9):1979-90. DOI: 10.1038/ismej.2015.11
19. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):242-9. DOI: 10.1038/nature11552
20. Wongsrikaew N, Kim H, Vichitphan K, et al. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2012;55:813-817. DOI: 10.1007/s13765-012-2175-5
21. Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. *Blautia* – a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1-21. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796
22. Pinkaew D, Changtam C, Tocharus C, Govitrapong P, Jumnonprakhon P, Suksamrarn A, et al. Association of Neuroprotective Effect of Di-O-Demethylcurcumin on A β 25-35-Induced Neurotoxicity with Suppression of NF- κ B and Activation of Nrf2. *Neurotox Res*. 2016 Jan;29(1):80-91. DOI: 10.1007/s12640-015-9558-4
23. Furuya H, Ide Y, Hamamoto M, Asanuma N, Hino T. Isolation of a novel bacterium, *Blautia glucerasei* sp. nov., hydrolyzing plant glucosylceramide to ceramide. *Arch Microbiol*. 2010 May;192(5):365-72. DOI: 10.1007/s00203-010-0566-8
24. Vaughn BP, Kaiser T, Staley C, Hamilton MJ, Reich J, Graiziger C, et al. A pilot study of fecal bile acid and microbiota profiles in inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Gastroenterol*. 2019 Jan 10;12:9-19. DOI: 10.2147/CEG.S186097
25. González-Sarrías A, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends Food Sci. Technol*. 2017;69:281-8. DOI: 10.1016/J.TIFS.2017.07.010
26. Braune A., Blaut M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*. 2016; 7(3):216-34. DOI: 10.1080/19490976.2016.1158395
27. Xu X, Xu P, Ma C, Tang J, Zhang X. Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnol Adv*. 2013 Mar-Apr;31(2):318-37. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.12.009
28. Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E, et al. antiSMASH 2.0 – a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jul;41(Web Server issue):W204-12. DOI: 10.1093/nar/gkt449
29. Dror B, Jurkevitch E, Cytryn E. State-of-the-art methodologies to identify antimicrobial secondary metabolites in soil bacterial communities – A review. *Soil Biol. Biochem*. 2020;147:107838. DOI: 10.1016/j.soilbio.2020.107838
30. Azevedo AC, Bento CB, Ruiz JC, Queiroz MV, Mantovani HC. Distribution and Genetic Diversity of Bacteriocin Gene Clusters in Rumen Microbial Genomes. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Oct;81(20):7290-304. DOI: 10.1128/AEM.01223-15
31. Hatziioanou D, Gherghisan-Filip C, Saalbach G, Horn N, Wegmann U, Duncan SH, et al. Discovery of a novel lantibiotic nisin O from *Blautia obeum* A2-162, isolated from the human gastrointestinal tract. *Microbiology (Reading)*. 2017 Sep;163(9):1292-1305. DOI: 10.1099/mic.0.000515
32. Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Sušac B, Miller L, et al. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host Microbe*. 2017 May 10;21(5):592-602.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2017.04.002
33. Козлова ИВ, Лаптева ЕА, Лекарева ЛИ. Неалкогольная жировая болезнь печени и кишечник: взаимосвязи и взаимовлияния. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017;138(2):86-91.
34. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019 Oct 4;5(1):28. DOI: 10.1038/s41522-019-0101-x
35. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Sorriquer F, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med*. 2013 Feb 21;11:46. DOI: 10.1186/1741-7015-11-46
36. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013;4:1829. DOI: 10.1038/ncomms2852
37. Benítez-Páez A, Gómez Del Pugar EM, López-Almela I, Moya-Pérez Á, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Depletion of *Blautia* Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic Phenotype Worsening. *mSystems*. 2020 Mar 24;5(2):e00857-19. DOI: 10.1128/mSystems.00857-19
38. Харитоновна ЛА, Папышева ОВ, Маяцкая ТА, Котайш ГА. Состояние микробиоты кишечника при дислипидемии у детей. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019;171(11):76-82. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-171-11-76-82
39. Железова МЕ, Бектур КБ, Шарипова РИ. Роль материнского микробиома в патогенезе преэклампсии. *Практическая медицина*. 2020;18(6):8-12. DOI: 10.32000/2072-1757-2020-6-8-12
40. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw*. 2014 Dec;14(6):277-88. DOI: 10.4110/in.2014.14.6.277
41. Мкртчян ЛС, Мазовка КЕ, Ткачев АВ. В лабиринтах патогенеза воспалительных заболеваний кишечника: эволюция микробиологической теории. *Практическая медицина*. 2022;20(1):8-13. DOI: 10.32000/2072-1757-2022-1-8-13
42. Chen L, Wang W, Zhou R, Ng SC, Li J, Huang M, et al. Characteristics of fecal and mucosa-associated microbiota in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2014 Aug;93(8):e51. DOI: 10.1097/MD.0000000000000051
43. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e39743. DOI: 10.1371/journal.pone.0039743
44. Luu TH, Michel C, Bard JM, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal Proportion of *Blautia* sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Nutr Cancer*. 2017 Feb-Mar;69(2):267-275. DOI: 10.1080/01635581.2017.1263750
45. Plichta DR, Juncker AS, Bertalan M, Rettedal E, Gautier L, Varela E, et al; Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) Consortium; Sommer MO, Ehrlich SD, Sicheritz-Pontén T, Brunak S, Nielsen HB. Transcriptional interactions suggest niche segregation among microorganisms in the human gut. *Nat Microbiol*. 2016 Aug 26;1(11):16152. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.152

References

1. Miller AL, Bessho S, Grando K, Tükel Ç. Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Front Immunol.* 2021 Feb 26;12:638867. DOI: 10.3389/fimmu.2021.638867
2. Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in Diverse Gut Communities. *Diversity.* 2013;(5):627-640. DOI: 10.3390/d5030627
3. Kalyana Chakravarthy S, Jayasudha R, Sai Prashanthi G, Ali MH, Sharma S, Tyagi M, et al. Dysbiosis in the Gut Bacterial Microbiome of Patients with Uveitis, an Inflammatory Disease of the Eye. *Indian J Microbiol.* 2018 Dec;58(4):457-469. DOI: 10.1007/s12088-018-0746-9
4. Laverde Gomez JA, Mukhopadhyay I, Duncan SH, Louis P, Shaw S, Collie-Duguid E, et al. Formate cross-feeding and cooperative metabolic interactions revealed by transcriptomics in co-cultures of acetogenic and amylolytic human colonic bacteria. *Environ Microbiol.* 2019 Jan;21(1):259-271. DOI: 10.1111/1462-2920.14454
5. Khoult Dzh. Opredelitel' bakterii Berdzhii. Tom 2. M.: Mir Publ., 1997;574-575. (In Russian).
6. Shin NR, Kang W, Tak EJ, Hyun DW, Kim PS, Kim HS, et al. *Blautia hominis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018 Apr;68(4):1059-1064. DOI: 10.1099/ijsem.0.002623
7. Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008 Aug;58(Pt 8):1896-902. DOI: 10.1099/ijms.0.65208-0
8. Touyama M, Jin JS, Kibe R, Hayashi H, Benno Y. Quantification of *Blautia wexlerae* and *Blautia luti* in human faeces by real-time PCR using specific primers. *Benef Microbes.* 2015;6(4):583-90. DOI: 10.3920/BM2014.0133
9. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res.* 2013 Mar;69(1):52-60. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.10.020
10. Yang J, Bindels LB, Segura Munoz RR, Martínez I, Walter J, Ramer-Tait AE, et al. Disparate Metabolic Responses in Mice Fed a High-Fat Diet Supplemented with Maize-Derived Non-Digestible Feruloylated Oligo- and Polysaccharides Are Linked to Changes in the Gut Microbiota. *PLoS One.* 2016 Jan 5;11(1):e0146144. DOI: 10.1371/journal.pone.0146144
11. Panasevich MR, Kerr KR, Dilger RN, Fahey GC Jr, Guérin-Deremaux L, Lynch GL, et al. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. *Br J Nutr.* 2015 Jan 14;113(1):125-33. DOI: 10.1017/S0007114514003274
12. Noriega BS, Sanchez-Gonzalez MA, Salyakina D, Coffman J. Understanding the Impact of Omega-3 Rich Diet on the Gut Microbiota. *Case Rep Med.* 2016;2016:3089303. DOI: 10.1155/2016/3089303
13. Endo A, Pärtty A, Kalliomäki M, Isolauri E, Salminen S. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. *Anaerobe.* 2014 Aug;28:149-56. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.06.006
14. Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res Rev.* 2017 May;35:36-45. DOI: 10.1016/j.arr.2017.01.001
15. Nakayama J, Watanabe K, Jiang J, Matsuda K, Chao SH, Haryono P, et al. Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep.* 2015 Feb 23;5:8397. DOI: 10.1038/srep08397
16. Lan D, Ji W, Lin B, Chen Y, Huang C, Xiong X, et al. Correlations between gut microbiota community structures of Tibetans and geography. *Sci Rep.* 2017 Dec 5;7(1):16982. DOI: 10.1038/s41598-017-17194-4
17. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol.* 2017 Jun 23;8:1162. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01162
18. Zhang J, Guo Z, Xue Z, Sun Z, Zhang M, Wang L, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *ISME J.* 2015 Sep;9(9):1979-90. DOI: 10.1038/ismej.2015.11
19. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012 Sep 13;489(7415):242-9. DOI: 10.1038/nature11552
20. Wongsrikaew N, Kim H, Vichitphan K, et al. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2012;55:813-817. DOI: 10.1007/s13765-012-2175-5
21. Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. *Blautia* – a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes.* 2021 Jan-Dec;13(1):1-21. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796
22. Pinkaew D, Changtam C, Tocharus C, Govitrapong P, Jumnonprakhon P, Suksamrarn A, et al. Association of Neuroprotective Effect of Di-O-Demethylcurcumin on Aβ₂₅₋₃₅-Induced Neurotoxicity with Suppression of NF-κB and Activation of Nrf2. *Neurotox Res.* 2016 Jan;29(1):80-91. DOI: 10.1007/s12640-015-9558-4
23. Furuya H, Ide Y, Hamamoto M, Asanuma N, Hino T. Isolation of a novel bacterium, *Blautia glucerasei* sp. nov., hydrolyzing plant glucosylceramide to ceramide. *Arch Microbiol.* 2010 May;192(5):365-72. DOI: 10.1007/s00203-010-0566-8
24. Vaughn BP, Kaiser T, Staley C, Hamilton MJ, Reich J, Graiziger C, et al. A pilot study of fecal bile acid and microbiota profiles in inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Gastroenterol.* 2019 Jan 10;12:9-19. DOI: 10.2147/CEG.S186097
25. González-Sarriás A, Espin JC, Tomás-Barberán FA. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends Food Sci. Technol.* 2017;69:281-8. DOI: 10.1016/J.TIFS.2017.07.010
26. Braune A., Blaut M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes.* 2016; 7(3):216-34. DOI: 10.1080/19490976.2016.1158395
27. Xu X, Xu P, Ma C, Tang J, Zhang X. Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnol Adv.* 2013 Mar-Apr;31(2):318-37. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.12.009
28. Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E, et al. antiSMASH 2.0 – a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jul;41(Web Server issue):W204-12. DOI: 10.1093/nar/gkt449
29. Dror B, Jurkevitch E, Cytryn E. State-of-the-art methodologies to identify antimicrobial secondary metabolites in soil bacterial communities – A review. *Soil Biol. Biochem.* 2020;147:107838. DOI: 10.1016/j.soilbio.2020.107838
30. Azevedo AC, Bento CB, Ruiz JC, Queiroz MV, Mantovani HC. Distribution and Genetic Diversity of Bacteriocin Gene Clusters in Rumen Microbial Genomes. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Oct;81(20):7290-304. DOI: 10.1128/AEM.01223-15
31. Hatzioanou D, Gherghisan-Filip C, Saalbach G, Horn N, Wegmann U, Duncan SH, et al. Discovery of a novel lantibiotic nisin O from *Blautia obeum* A2-162, isolated from the human gastrointestinal tract. *Microbiology (Reading).* 2017 Sep;163(9):1292-1305. DOI: 10.1099/mic.0.000515
32. Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Sušac B, Miller L, et al. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host Microbe.* 2017 May 10;21(5):592-602.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2017.04.002
33. Kozlova IV, Lapteva EA, Lekareva LI. Nonalcoholic fatty liver disease and colon: the relationship and interaction. *Experimental and clinical gastroenterology.* 2017;138(2):86-91. (In Russian).

34. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. NPJ Biofilms Microbiomes. 2019 Oct 4;5(1):28. DOI: 10.1038/s41522-019-0101-x
35. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Sorriquer F, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. BMC Med. 2013 Feb 21;11:46. DOI: 10.1186/1741-7015-11-46
36. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Nat Commun. 2013;4:1829. DOI: 10.1038/ncomms2852
37. Benítez-Páez A, Gómez Del Pugar EM, López-Almela I, Moya-Pérez Á, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Depletion of *Blautia* Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic Phenotype Worsening. mSystems. 2020 Mar 24;5(2):e00857-19. DOI: 10.1128/mSystems.00857-19
38. Kharitonova LA, Papisheva OV, Mayatskaya TA, Kotaysh GA. State of the microbiota of bowels with dislipidemii in the children. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2019;171(11):76-82. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-171-11-76-82 (In Russian).
39. Zhelezova ME, Bektur BK, Sharipova RI. Role of the maternal microbiome in the pathogenesis of preeclampsia. Practical Medicine. 2020;18(6):8-12. DOI: 10.32000/2072-1757-2020-6-8-12 (In Russian).
40. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. Immune Netw. 2014 Dec;14(6):277-88. DOI: 10.4110/in.2014.14.6.277
41. Mkrтчan LS, Mazovka KE, Tkachev AV. In the labyrinths of pathogenesis of inflammatory bowel diseases: evolution of microbiology theory. Practical Medicine. 2022;20(1):8-13. DOI: 10.32000/2072-1757-2022-1-8-13 (In Russian).
42. Chen L, Wang W, Zhou R, Ng SC, Li J, Huang M, et al. Characteristics of fecal and mucosa-associated microbiota in Chinese patients with inflammatory bowel disease. Medicine (Baltimore). 2014 Aug;93(8):e51. DOI: 10.1097/MD.0000000000000051
43. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. PLoS One. 2012;7(6):e39743. DOI: 10.1371/journal.pone.0039743
44. Luu TH, Michel C, Bard JM, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal Proportion of *Blautia* sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. Nutr Cancer. 2017 Feb-Mar;69(2):267-275. DOI: 10.1080/01635581.2017.1263750
45. Plichta DR, Juncker AS, Bertalan M, Rettedal E, Gautier L, Varela E, et al; Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) Consortium; Sommer MO, Ehrlich SD, Sicheritz-Pontén T, Brunak S, Nielsen HB. Transcriptional interactions suggest niche segregation among microorganisms in the human gut. Nat Microbiol. 2016 Aug 26;1(11):16152. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.152

Информация о соавторах:

Бажукова Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СГМУ «Северный государственный медицинский университет»
ORCID: 0000-0002-7890-2341

Давидович Наталья Валерьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СГМУ «Северный государственный медицинский университет»
ORCID: 0000-0002-6414-9870

Сабанаев Михаил Алексеевич, студент 6-го курса медико-профилактического дела и медицинской биохимии: отделение медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет»
ORCID: 0000-0001-5642-3019

Information about co-authors:

Tatyana A. Bazhukova, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics, Northern State Medical University
ORCID: 0000-0002-7890-2341

Natalia V. Davidovich, PhD, MD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics, Northern State Medical University
ORCID: 0000-0002-6414-9870

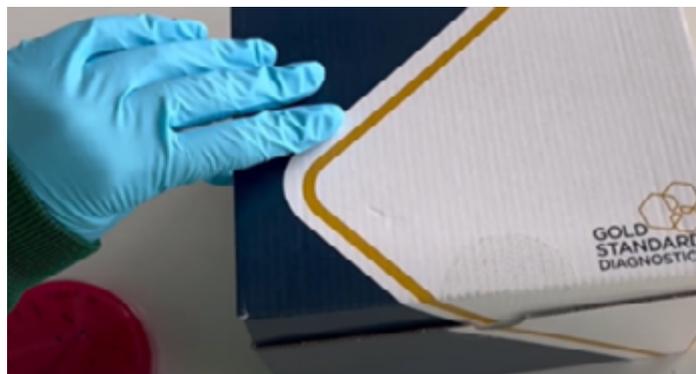
Mikhail A. Sabanaev, 6th year student of preventive health care and medical biochemistry, Department of Medical Biochemistry, Northern State Medical University
ORCID: 0000-0001-5642-3019

НОВОСТИ НАУКИ

Наборы для латексной агглютинации Microgen на сальмонеллу, легионеллу или золотистый стафилококк ID

Gold Standard Diagnostics запустила тесты быстрой латексной агглютинации Microgen – быстрые, простые и экономичные методы для подтверждающей идентификации колоний сальмонеллы, легионеллы или золотистого стафилококка в пробах пищевых продуктов и окружающей среды.

Эти тесты, результаты которых достигаются всего за 2 минуты, легко интегрируются в рабочие процессы лаборатории, предлагая высокоспецифичную и чувствительную альтернативу традиционным методам культивирования. Кроме того, их удобный дизайн не требует специального обучения или оборудования, что позволяет лабораториям немедленно внедрить их.



Microgen Latex Agglutination Kits [Электронный ресурс].

Режим доступа: <https://www.rapidmicrobiology.com/news/microgen-latex-agglutination-kits-for-salmonella-legionella-or-staphylococcus-aureus-id> (дата обращения: 20.06.2024).



Уважаемые коллеги!

Информируем Вас о проведении IX Национального конгресса бактериологов, посвященного 50-летию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, в соответствии с Приказом Роспотребнадзора от 04.04.2024 №245. Мероприятие пройдет в кластере «Ломоносов» Инновационного научно-технологического центра МГУ «Воробьевы горы» (г. Москва, Раменский бульвар, 1)

Основные тематические направления конгресса и конференции

- История развития и основные направления деятельности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.
- Результаты научных исследований в рамках Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости, пятилетие деятельности которого отмечается в 2024 г.
- Состояние и тенденции развития медицинской микробиологии: от классической микробиологии до геномных исследований.
- Современные методы и алгоритмы идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, в т.ч. общих для человека и животных, поиск информативных маркеров для целей лабораторной диагностики.
- Развитие генетических технологий для создания инновационных средств профилактики, лечения и диагностики инфекционных болезней.
- Лекарственная устойчивость патогенов: состояние проблемы и направления исследований.
- Новые аспекты санитарно-бактериологических исследований качества и безопасности пищевых продуктов.
- Проблемы совершенствования нормативно-правовой базы по лабораторной диагностике инфекционных болезней, санитарно-микробиологическому контролю качества и безопасности пищевых продуктов, воды и кормов для животных.
- Актуальные вопросы организации деятельности бактериологических лабораторий системы Роспотребнадзора на современном этапе.

Контактное лицо по научной программе

Домотенко Любовь Викторовна, к.х.н., зав. лаб. ФБУН ГНЦПМБ
E-mail: domotenko@obolensk.org. Тел.: +7 (916) 334-55-26

Непрерывное медицинское образование

Планируется аккредитация научной программы Конгресса в системе НМО.

Дополнительное профессиональное обучение

Предусмотрен очно-заочный образовательный цикл с применением дистанционных технологий по теме «Генетические подходы в лабораторной диагностике и профилактике инфекционных заболеваний» (объем 16 академических часов), разработанный в рамках

Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости. По окончании курса будут выданы удостоверения установленного образца.

Правила оформления тезисов и формат изложения материала

Текст тезисов не должен превышать 3000 знаков с пробелами и должен быть напечатан в редакторе MS Word шрифтом Times New Roman 12 через один интервал. На первой строке размещается название тезисов (строчными буквами без аббревиатур), ниже – фамилия и инициалы авторов. Далее указываются организация, город, страна (допускается использование официального сокращенного наименования организации, например – ВМедА им. С.М.Кирова, СЗГМУ им. И.И.Мечникова).

Рекомендуемая структура тезисов: введение, цель, материалы и методы, результаты, заключение (выводы).

В тексте тезисов не должны содержаться рисунки, графики, таблицы, диаграммы и другие иллюстрации.

Тезисы докладов будут напечатаны в сборнике материалов Конгресса. Сборник тезисов будет размещен в Национальной электронной библиотеке и проиндексирован в РИНЦ.

Тезисы докладов должны быть высланы не позднее **01 августа 2024 г.**

Контактное лицо для оформления тезисов

Говорунов Игорь Геннадиевич,
тел.: +7 (4967) 36-00-46, +7 (903) 979-46-60
E-mail: govorunov@obolensk.org

Регистрация участников

Участникам Конгресса необходимо пройти регистрацию на сайте технического организатора (<http://expodata.info>).

Размещение в гостинице и оплата за проживание производится самостоятельно участниками Конгресса.

В рамках работы Конгресса пройдет выставка производителей медицинских изделий.

Вход на выставку и заседания Конгресса свободный.

Технический организатор: ООО «Экспо Пресс».

По вопросам участия в выставке и выступлениями с коммерческими докладами обращаться к руководителю проекта

Львову Михаилу Геннадьевичу, тел.: +7 (495) 617-36-79,
E-mail: Lvov.m.g@inbox.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 обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org