

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2024 • ТОМ 9 • №3

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

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

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

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

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

Подписано в печать 30.09.2024 г.

Отпечатано: Мастерская печати Old School,
603105, Нижний Новгород, ул. Чачиной, 39а, оф. 5

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Регистрационный номер
ПИ №ФС 77-66792 от 15.08.2016 г.

Журнал «Бактериология»
является рецензируемым изданием.

Выходит четыре раза в год.
Основан в 2016 году.

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.

Тираж 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

ФБУН ГНЦ ПМБ 50 лет – достижения и перспективы развития	5
---------------------------------------------------------------	---

Экспериментальные статьи

Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа <i>Escherichia coli</i> при использовании различных алгоритмов получения целевого белка М.А.Шкуратова, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, О.В.Калмантаева, А.Е.Хлынцева, А.К.Сурин, В.В.Фирстова	8
Особенности состава кишечной микробиоты у пациенток с наружным генитальным эндометриозом В.А.Пронина, А.Б.Гордеев, В.В.Муравьева, А.В.Скоробогатый, К.Н.Жигалова, П.А.Денисов, Г.Е.Чернуха, Т.В.Припутневич	20
Модель пневмококковой пневмонии у мышей А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина	28
Диагностика завозного случая лепры в России с использованием серологических методов и бактериоскопии А.Г.Королёва-Ушакова, Е.В.Баранова, Е.А.Ганина, А.Г.Шевяков, М.В.Храмов, С.Ф.Бикетов, И.А.Дятлов	37
Разработка и оценка эффективности отечественного селективного бульона Жиолитти–Кантони для накопления и идентификации <i>Staphylococcus aureus</i> О.В.Полосенко, М.В.Храмов, А.Ю.Сёмина	46
Порядок проведения оценки защитной эффективности инженерных систем биологической безопасности в лабораториях с различным уровнем биологической защиты О.Б.Шишкина, Е.А.Тюрин, С.А.Благодатских, А.А.Лебедькова	52
Микробиологический мониторинг возбудителей нозокомиальных инфекций из группы ESCAPE в медицинских организациях г. Перми Н.С.Боталов, Т.М.Некрасова, Н.И.Боталова, С.А.Лукьянцева, Т.И.Карпунина	57
Анализ санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан Л.Ф.Гафарова, М.А.Харитоновна, Г.Г.Бадамшина, Е.П.Сизова, Л.В.Ставропольская, О.Н.Ильинская	62
Характеристика генов факторов патогенности и оценка цитотоксической активности штаммов <i>Vibrio vulnificus in vitro</i> О.А.Цырулина, С.Ю.Темякова, В.В.Евдокимова, Л.П.Алексеева, О.С.Чемисова	70
Определение антагонистической активности пробиотических штаммов в отношении клинических изолятов и микроорганизмов, персистирующих в пищеварительном тракте пушных зверей семейства <i>Canidae</i> клеточного содержания А.С.Сюткина, Т.А.Скуднова, В.Г.Комоско, Г.В.Комоско, О.А.Новикова	77
Оценка способности <i>Klebsiella pneumoniae</i> образовывать биопленку С.В.Титова, А.С.Анисимова, Н.В.Аронова	83
Изучение антагонистических свойств пробиотических бактерий, выделенных в Узбекистане З.О.Шарипова, Л.И.Абдульмянова, Н.Т.Ёдгорова	92

Обзорные статьи

Генетическая обусловленность устойчивости к тяжелым металлам и ее связь с антибиотикорезистентностью у микроорганизмов, в том числе у бактерий рода <i>Vibrio</i> А.В.Евтеев, С.О.Водопьянов	97
Энтерококковые инфекции у коронавирусных больных Е.Е.Пославская	105
Особенности моделирования сибирской язвы с использованием различных видов мелких лабораторных животных К.В.Хлопова, Г.М.Титарева, И.В.Бахтеева, Т.Б.Кравченко, В.С.Тимофеев	110
Исследования четвертичных аммониевых соединений в качестве противомикробных агентов Ю.А.Буковская, Т.Ф.Черных	118
Правила оформления статей (основные положения)	125

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

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

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

A.P.Anisimov, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Balakhonov, Sc.D., prof. (Russia)
A.N.Kulichenko, academician of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
V.V.Kutyrev, academician of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
N.V.Rudakov, Sc.D., prof. (Russia)
Sun Chzhichzhou, PhD (China)

Editorial Board

Z.Adyaasyren, Sc.D., prof. (Mongolia)	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

Federal Budget Institution of Science "State Scientific Center For Applied Microbiology and Biotechnology" 50 years – achievements and development prospects	5
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

Experimental Articles

Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from <i>Escherichia coli</i> using various algorithms for producing the target protein <i>M.A.Shkuratova, M.A.Maryin, M.M.Rogozin, O.V.Kalmantaeva, A.E.Khlyntseva, A.K.Surin, V.V.Firstova</i>	8
Features of the intestinal microbiota composition in patients with external genital endometriosis <i>V.A.Pronina, A.B.Gordeev, V.V.Muravieva, A.V.Skorobogatiy, K.N.Zhigalova, P.A.Denisov, G.E.Chernukha, T.V.Priputnevich</i>	20
Model of pneumococcal pneumonia in mice <i>A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina</i>	28
Diagnostics a case of leprosy imported to the Russian Federation using serologic methods and bacterioscopy <i>A.G.Korolyova-Ushakova, E.V.Baranova, E.A.Ganina, A.G.Shevyakov, M.V.Khramov, S.F.Biketov, I.A.Dyatlov</i>	37
Development and evaluation of the effectiveness of the domestic selective Giolitti–Cantoni broth for the accumulation and identification of <i>Staphylococcus aureus</i> <i>O.V.Polosenko, M.V.Khramov, A.Yu.Semina</i>	46
Procedure for assessing the protective efficiency of engineering systems of biological safety in laboratories with different levels of biological protection <i>O.B.Shishkina, E.A.Tyurin, S.A.Blagodatskikh, A.A.Lebedkova</i>	52
Microbiological monitoring of ESCAPE group nosocomial infection agents in medical organizations of Perm <i>N.S.Botolov, T.M.Nekrasova, N.I.Botalova, S.A.Lukyantseva, T.I.Karpunina</i>	57
Analysis of the sanitary and bacteriological state of therapeutic mud used in sanatoriums of the Republic of Tatarstan <i>L.F.Gafarova, M.A.Kharitonova, G.G.Badamshina, E.P.Sizova, L.V.Stavropolskaya, O.N.Ilyinskaya</i>	62
Characterization of genes of pathogenicity factors and assessment of cytotoxic activity of <i>Vibrio vulnificus in vitro</i> <i>O.A.Tsyurulina, S.Yu.Temyakova, V.V.Evdokimova, L.P.Alekseeva, O.S.Chemisova</i>	70
Determination of antagonistic activity of probiotic strains against clinical isolates and microorganisms persisting in the digestive tract of cage-containing fur animals of the <i>Canidae</i> family <i>A.S.Syutkina, T.A.Skudnova, V.G.Komosko, G.V.Komosko, O.A.Novikova</i>	77
Assessment of the ability of <i>Klebsiella pneumoniae</i> to form biofilm <i>S.V.Titova, A.S.Anisimova, N.V.Aronova</i>	83
Study of the antagonistic properties of newly isolated local strains of probiotic bacteria in Uzbekistan <i>Z.O.Sharipova, L.I.Abdulmyanova, N.T.Yodgorova</i>	92

Review Articles

Genetic conditionality of heavy metals resistance and its relation to antibiotic resistance in microorganisms, including bacteria of the genus <i>Vibrio</i> <i>A.V.Evteev, S.O.Vodopyanov</i>	97
Enterococcal infections in coronavirus patients <i>E.E.Poslavskaya</i>	105
Features of modeling anthrax on various types of small laboratory animals <i>K.V.Khlopova, G.M.Titareva, I.V.Bakhteeva, T.B.Kravchenko, V.S.Timofeev</i>	110
Studies of quaternary ammonium compounds as antimicrobial agents <i>Yu.A.Bukovskaya, T.F.Chernykh</i>	118
Instructions for Authors	125

ФБУН ГНЦ ПМБ 50 лет – достижения и перспективы развития

В сентябре 2024 г. состоялся IX Национальный конгресс бактериологов, посвященный 50-летию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора. Конгресс объединил научных специалистов в области клинической и санитарной микробиологии, биотехнологии, эпидемиологии, работников Роспотребнадзора, практического здравоохранения и преподавателей высших учебных заведений, подвел итоги многолетней работе института, оценив его достижения и дальнейшие перспективы научных исследований.

Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии (ВНИИ ПМ) создан 1 января 1974 г. в соответствии с приказом начальника Главного управления микробиологической промышленности при Совете Министров СССР В.Д.Беляева. В том же году вышло Постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускоренному развитию молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве», которое обозначило цель – в кратчайшие сроки догнать ведущие западные страны в данных областях науки и покончить с остатками господствующей в предыдущие два десятилетия «лысенковщиной». Инициировали данное постановление и создание ВНИИ ПМ ведущие ученые-академики страны, работающие не только в области биологии и медицины, но и в других областях науки, осознающие критическую важность для страны развития молекулярно-биологического направления. Институт непосредственно подчинялся НПО «Биопрепарат», который последовательно возглавляли Огарков В.И. и Калинин Ю.Т. Была поставлена задача скорейшим образом достичь передового уровня развития молекулярной биологии, молекулярной генетики и других областей естествознания, непосредственно связанных с изучением физико-химических основ жизненных явлений, а также активизировать исследования в целях противодействия активности западных стран и защиты населения от потенциальных биологических агентов.

Институт начал строиться на совершенно не тронутой лесной площадке Серпуховского района Московской области, вдали от городов и жилых поселков, что определяло возможность работы с опасными патогенами. Новый поселок получил название Оболенск. При двух директорах института – Виноградове-Волжинском Дмитрие Владимировиче и Уракове Николае Николаевиче – было начато и завершено строительство комплекса сооружений, обеспечивающих выполнение задач института, в т.ч. высокотехнологичного корпуса №1 для работы с особо опасными инфекциями. К 1990 г. число сотрудников центра приблизилось к 3000, было защищено более 50 докторских и 200 кандидатских диссертаций, обучение прошли более 120 аспирантов, было разработано и зарегистрировано множество научно-технологических документов на препараты, лабораторных методик, фармстатей, технических условий, методических пособий и рекомендаций, новейших приборов для биомедицинских исследований, выполнен ряд федеральных целевых программ.

Во время перестройки и постперестроечный период институт переживал нелегкие времена, многие сотрудники перешли на работу в коммерческие структуры, несколько человек уехали за границу в поисках возможности продолжения своих научных исследований.



В 1992 г. в Москве на основании соглашения России с западными странами был учрежден Международный научно-технический центр (МНТЦ), который начал финансировать множество научных проектов в области микробиологии и молекулярной генетики, что позволило сохранить часть коллектива исследователей центра. За время работы по программам МНТЦ в нашем центре было выполнено 73 проекта на сумму более 20 млн долларов. В этот период центр был оснащен современным оборудованием, развилась коллаборация с зарубежными учеными, проводились обучающие семинары и конференции в ведущих мировых научных центрах.

Новый этап развития центра начался в 2005 г., когда вышло Распоряжение Правительства РФ о создании Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) в составе Роспотребнадзора. В немалой степени сохранению института и определению перспектив его деятельности способствовал академик Геннадий Григорьевич Онищенко, Главный государственный санитарный врач России. Задачами центра было определено проведение фундаментальных и прикладных научных исследований и работ в области эпидемиологии, бактериологии и биотехнологии, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая опытно-промышленное производство биотехнологической продукции. Институт включился в работу по решению задач государственной санитарно-эпидемиологической службы России, выполнив ряд важных проектов в этом направлении, и принял непосредственное участие в формировании и реализации Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации». В этот период центр стал инициатором создания Совета молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, и с 2007 г. были проведены три первые конференции в Оболенске.

В современный период развития института под руководством профессора Анны Юрьевны Поповой, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации и руководителя Роспотребнадзора, продолжилось оснащение и совершенствование инфраструктуры Центра, что существенным образом сказалось на эффективности его научной, практической и производственной деятельности. Продолжилось выполнение задач Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 гг.)», была сформирована и реализуется Госпрограмма «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации» (2021–2024 гг.). В рамках Федерального проекта «Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по приоритетным исследовательским направлениям» национального проекта «Наука и университеты» создан и успешно функционирует «Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий» (2019–2030 гг.). Одним из существенных локомотивов в научном сопровождении деятельности санэпидслужбы стало формирование Федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)», предполагающего разработку диагностических и профилактических средств инфекционных заболеваний, реконструкции здания и лабораторий и строительство новых.

Предпосылками для выбора основного направления исследований ГНЦ ПМБ, связанного с углубленным изучением функций патогенов, стали необходимость усиления контроля за исследованиями по усилению функций патогенов, необходимость изучения влияния природных генетических мутаций, а также реальная опасность утечки новых форм микроорганизмов из лабораторий или создания высококонтагиозных штаммов в злонамеренных целях.

Одним из важных достижений в кадровой политике ГНЦ ПМБ явилась подготовка когорты специалистов по геной инженерии, способных решать сложные задачи по созданию биотехнологически значимых штаммов продуцентов целевых продуктов, необходимых для создания средств специфической профилактики, диагностических и лечебных препаратов.

В результате выполнения существующих программ были разработаны технологические приемы создания инновационных средств специфической профилактики особо опасных инфекций бактериальной природы. Для этого разработаны следующие платформы: живые прецизионно аттенуированные вакцины, субъединичные белковые или гликопротеидные вакцины, субъединичные полисахаридные вакцины, бактериальные тени, везикулы, наноконпартаменты или инкапсулины, соответствующие основным направлениям мировой науки в данной области. Сочетание разработанных платформ позволило в ряде случаев существенно поднять эффективность и безопасность новых бактериальных вакцин. Среди разработанных вакцин, имеющих в т.ч. и стратегическое значение: «Чумная рекомбинантная трехкомпонентная субъединичная» (ведется доклиника на павианах), «Туляремийная живая рекомбинантная улучшенная» (ведется доклиника на павианах), «Эшерихиозная субъединичная полисахаридная антитоксическая (против O157:H7 и O104:H4)» (начата доклиника), «Сибиреязвенная рекомбинантная субъединичная» (начата доклиника), «Бруцеллезная рекомбинантная на основе обратной вакцинологии» (разработка). Кроме

того, разработаны эффективные прототипы вакцин против ряда возбудителей III–IV групп патогенности, как средство борьбы с нарастающей резистентностью клинических штаммов.

Разработана полная отечественная линейка для создания рекомбинантных человеческих моноклональных антител (МКА) для лечения поражений людей биотоксинами. Препараты МКА получены к ботулотоксину типа А, рицину, шигатоксину 2-го типа, сибиреязвенному токсину, коронавирусу. Данная линейка расширяется.

В направлении совершенствования методов биодетекции в центре получили развитие геномные и метагеномные методологии, основанные на секвенировании, ускоренные методы мультиплексного ПЦР-анализа, использование геномного редактирования CRISPR-Cas детекцией, секвенирование – полногеномное и таргетное, иммунохимический анализ с собственными МКА и аптамерами, иммунохроматографические мультиплексные тест-системы, иммуно-ПЦР, клеточный сортинг с МКА для обогащения проб. Для восьми особо опасных инфекций реализована система DETECTR, которая выявляет ДНК-мишени с помощью комплексов gRNA-Cas12a (собственные реагенты), используя для детекции флюоресценцию, иммунохроматографию.

В области борьбы с резистентностью, помимо разработки вакцин, исследована роль интегронов в мобилизации, экспрессии и распространении генов резистентности, встроенных в генные кассеты, определяющих множественную лекарственную устойчивость. Идентифицировано около 1000 интегронов и более 100 разных генных кассет в геномах штаммов патогенов.

Для практической борьбы с резистентностью разработаны альтернативные антибиотикам препараты биологического происхождения: рекомбинантный эндолизин против *Staphylococcus aureus*, деполимеразы рекомбинантные против клебсиелл и ацетобактера, генноинженерный бактериоцин мундтицин. Все эти препараты доведены до возможности масштабного выпуска в биотехнологических производствах.

Для решения проблем молекулярной эпидемиологии и разработки средств борьбы с инфекциями создан «Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов», для которого разработано программное обеспечение, позволяющее включать данные о генотипе и фенотипе хранящихся в коллекциях штаммов патогенов. Суммарный объем хранения информации в каталоге составляет около 190 терабайт, что эквивалентно примерно 500 тыс. штаммов. Одновременно осуществляются два процесса – создание и совершенствование каталога в рамках геномного центра и его наполнение информацией из коллекционных фондов учреждений Роспотребнадзора в рамках программы «Санитарный щит».

Существенное внимание в центре уделяется производству средств диагностики, всего осуществляется выпуск 170 наименований препаратов, среди которых готовые сухие питательные среды (порядка 120 т в год), готовые питательные среды, иммунохроматографические тесты в полном отечественном цикле с использованием собственных МКА, ПЦР-тест-системы.

Одной из наиболее важных функций центра является проведение эпидемиологических расследований в рамках работы шести действующих референс-центров и испытательного лабораторного центра. Эта деятельность занимает значительное место в работе института, позволяя использовать собственные разработки в области биодетекции в реальной деятельности, давая возможность отслеживать тенденции в изменчивости наиболее актуальных патогенов и определять пути их распространения.

В 2016 г. был создан журнал «Бактериология», учредителем которого стал ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора. К настоящему времени вышло 32 номера журнала, в апреле 2023 г. он включен в перечень ВАК по 5 специальностям. Центром проведено 9 Национальных конгрессов бактериологов, несколько лет успешно работает «Национальное научно-практическое общество бактериологов», включающее более 600 членов и более 5000 респондентов. Созданная Центром триада ЖУРНАЛ – ОБЩЕСТВО – КОНГРЕСС находится в постоянном развитии и призвана объединять бактериологов страны и ближнего зарубежья, обеспечивая их новыми научными и практическими знаниями в данной профессиональной области, что в итоге существенным образом сказывается на качестве бактериологических исследований, возможностях лечения инфекционных заболеваний и эффективности купирования вспышек, вызванных патогенными микроорганизмами.

Таким образом, юбилейный конгресс, посвященный 50-летию ФБУН ГНЦ ПМБ, помимо реализации важной и насыщенной научной программы, позволил оценить достижения научного центра за многие годы работы в сфере здравоохранения, дать ей достаточно высокую оценку, определить основные направления развития как центра, так и бактериологической науки в целом в нашей стране.

Главный редактор, академик РАН И.А.Дятлов

Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* при использовании различных алгоритмов получения целевого белка

М.А.Шкуратова, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, О.В.Калмантаева, А.Е.Хлынцева, А.К.Сурин, В.В.Фирстова

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

Шигатоксин (Stx), продуцируемый *Escherichia coli*, является основной причиной желудочно-кишечных расстройств, включая геморрагический колит, а также возникновения гемолитико-уремического синдрома. Представители семейства Stx имеют АВ-структуру и состоят из токсичной А-субъединицы и пентамера из рецептор-связывающих В-субъединиц. Для изучения иммунопатогенеза, конструирования диагностических тест-систем, а также при создании терапевтических моноклональных антител необходимо получение рекомбинантного белка. Токсичность А-субъединицы шигатоксина препятствует получению высоких выходов белка за счет снижения плотности клеток культуры и/или ограничения количества белка внутри клетки-продуцента.

В представленной работе была проанализирована экспрессия А-субъединицы шигатоксина 2-го типа шестью разными продуцентами *E. coli* и синтез В-субъединицы одним продуцентом при различных условиях культивирования. В результате было выявлено, что оптимальная продукция А- и В-субъединиц шигатоксина 2-го типа наблюдалась в составе химерного продукта с SUMO-пептидом штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS.

Экспрессию проводили в установленных в ходе исследования условиях культивирования: продуцента субъединицы А – 20°C, 10 мкМ индуктора, 16 ч; продуцента субъединицы В – 20°C, 100 мкМ индуктора, 16 ч. Фрагмент SUMO-His был удален с помощью протеазы, и в результате работы был получен белок без дополнительных аминокислотных последовательностей. Установленный в ходе исследования алгоритм получения субъединиц использовали для получения целевого белка.

Конечный выход А- и В-субъединиц шигатоксина 2-го типа составил 1,5 и 4 мг с литра культуральной жидкости соответственно. Идентичность рекомбинантных пептидов последовательностям Stx2A и Stx2B подтвердили методом масс-спектрометрии. Доказали функциональную активность полученных белков и образование холотоксина при соединении растворов субъединиц *in vitro*.

Ключевые слова: шигатоксин 2-го типа, рекомбинантный белок, инактивирующий рибосомы белок, культивирование

Для цитирования: Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Калмантаева О.В., Хлынцева А.Е., Сурин А.К., Фирстова В.В. Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* при использовании различных алгоритмов получения целевого белка. Бактериология. 2024; 9(3): 8–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19

Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from *Escherichia coli* using various algorithms for producing the target protein

M.A.Shkuratova, M.A.Maryin, M.M.Rogozin, O.V.Kalmantaeva, A.E.Khlyntseva, A.K.Surin, V.V.Firstova

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

Для корреспонденции:

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзор

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,

Территория «Квартал А», 24

E-mail: shkuratova@obolensk.org

Телефон: (4967) 36-00-03

Статья поступила 15.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, 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) 36-0147

E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 15.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

Shiga toxin (Stx) produced by *Escherichia coli* is a main cause of gastrointestinal disorders, including hemorrhagic colitis, as well as of hemolytic-uremic syndrome. Members of the Stx family have an AB structure and consist of a toxic A subunit and a pentamer of receptor-binding B subunits. To study immunopathogenesis, design diagnostic test systems, and to create therapeutic monoclonal antibodies, it is necessary to produce a recombinant protein. The toxicity of the Stx A subunit prevents the production of the high-yield protein by reducing the density of culture cells and/or limiting the amount of the protein inside a producing cell.

The present work dealt with expression of the Stx2 A subunit by six different *E. coli* producers as well as with synthesis of the B subunit by the same one producer under different culture regimen. As a result, it was revealed that the optimal production of Stx2 A and B subunits by *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain was observed as a part of a chimeric product with a SUMO protein. Expression was performed under culture conditions determined during the research. The A subunit producer was cultured at 20°C in the presence of 10 µM inducer for 16 h. The B subunit producer was cultured at 20°C with 100 µM inducer for 16 h. The SUMO-His fragment was excised with protease, and as a result, of the work, a protein was obtained without additional amino acid sequences. The algorithm for producing the subunits established during the research was used to obtain the target protein

The final yield of the Stx2 A and B subunits was 1.5 mg/L and 4 mg/L of the culture fluid, correspondingly. The identity of the recombinant peptides to the Stx2 A and Stx2 B sequences was confirmed by mass spectrometry. The functional activity of the produced proteins and the formation of the holotoxin during combining solutions of the subunits *in vitro* were confirmed.

Key words: shiga toxin type 2, recombinant protein, ribosome inactivating protein, cultivation

Shkuratova M.A., Maryin M.A., Rogozin M.M., Kalmantaeva O.V., Khlyntseva A.E., Surin A.K., Firstova V.V. Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from *Escherichia coli* using various algorithms for producing the target protein. *Bacteriology*. 2024; 9(3): 8–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19

Пroduцирующие шигатоксин *Escherichia coli* (STEC) являются возбудителями тяжелой пищевой инфекции, которая может привести к опасным для жизни осложнениям, варьирующим от кровавой диареи и геморрагического колита до гемолитико-уремического синдрома (ГУС) и неврологических проблем [1]. Основными факторами патогенности STEC-штаммов являются шигатоксины (Stx), которые подразделяются на 2 типа: шигатоксин типа 1 (Stx1) и шигатоксин типа 2 (Stx2), гомологичный шигатоксину 1-го типа на 56% [2]. При этом штаммы *E. coli*, продуцирующие Stx2, более вирулентны и чаще связаны с развитием ГУС у людей [3]. В связи с этим проблема своевременной диагностики, профилактики и терапии STEC-инфекции является актуальной. Для разработки средств диагностики и терапии необходимо получение рекомбинантного Stx2.

Все члены семейства шигатоксинов сходны по строению и механизму действия. Данные белки представляют собой двухкомпонентные молекулы, в которых А-субъединица обладает ферментативной активностью, а В-субъединица отвечает за связывание с рецептором. Представители семейства относятся к группе токсинов, инактивирующих рибосомы, и вследствие этого ведут к ингибированию синтеза белка в клетке, индуцированию апоптоза, а также могут вызывать измененную экспрессию генов/белков в эпителиальных клетках, эндотелиальных клетках, моноцитах и мезангиальных клетках [4].

Цельный токсин (холотоксин, голотоксин) имеет структуру АВ₅, т.е. он образован одной крупной (32–33 кДа) А-субъединицей и пятью небольшими (7–8 кДа) В-субъединицами, формирующими пентамерное кольцо (35–40 кДа). Общая масса белка составляет ~70 кДа [5]. Пентамер из В-субъединиц выполняет рецептор-связывающую функцию и обеспечивает перемещение холотоксина внутрь клеток-мишеней посредством эндоцитоза. Функциональным рецептором Stx1 и Stx2 цитоплазматических мембран эукариотических клеток является нейтральный гликофинголипид глоботриазиоилцерамид (Gb3) или глоботетраоилцерамид (Gb4) [1, 6]. Энзиматическая субъединица А состоит из двух фрагментов (А1 и А2), соединенных дисульфидной

связью. Небольшой фрагмент А2 обеспечивает связывание с пентамером из В-субъединиц через центральную пору, а фрагмент А1 отвечает за проявление токсичности [1, 7]. Между фрагментами StxA расположен узнаваемый протеазами цитозоля участок. В этом месте субъединица разрезается при попадании в клетку, после чего фрагменты остаются соединенными между собой только дисульфидной связью. Полный разрыв происходит, когда токсин попадает в эндоплазматическую сеть [8, 9]. Тогда А1-фрагмент выходит в цитозоль, попадает к рибосомам и инактивирует их, отщепляя аденин на 28S рРНК 60S-субъединицы эукариотических рибосом или 23S рРНК 50S-субъединицы прокариотических рибосом у большинства видов организмов [1, 10]. В результате ингибирования синтеза белка запускаются необратимые процессы, приводящие к гибели клетки [4].

Использование анатоксина в лабораторных экспериментах затруднено из-за низкого выхода белка при выделении из естественных продуцентов [11]. Несмотря на большое количество статей, в которых описываются различные подходы к получению рекомбинантных шигатоксинов [11–15], остается актуальной проблема получения полноразмерных биологически активных шигатоксинов и увеличения конечного выхода рекомбинантных белков. Это связано с тем, что токсичная А-субъединица может приводить к мутациям, нестабильности штаммов экспрессии (модификации и/или гибели продуцентов), многоэтапности и трудоемкости процесса очистки белков [14]. Также трудность получения холотоксина сопряжена с нестабильностью отдельных субъединиц. В конце концов, неестественно высокие скорости синтеза токсичного белка могут приводить к отсутствию дисульфидных связей и неправильной укладке белка, что, в свою очередь, ведет к деградации белка или образованию телец включения [11, 14].

Для увеличения выхода конечного продукта, в первую очередь, удобно синтезировать субъединицы отдельно друг от друга и производить сборку после очистки [11]. Также раздельное получение субъединиц упрощает работу с продуцентами с точки зрения биологической безопасности (про-

дуценты холотоксина, согласно СанПиНам, с 2011 г. относятся ко II группе патогенности) [16].

Таким образом, при получении рекомбинантного шигатоксина 2-го типа для увеличения выхода конечного продукта оптимально синтезировать субъединицы отдельно, особое внимание необходимо уделить А-субъединице, оказывающей токсический эффект на клетки-продуценты.

Цель нашего исследования заключалась в оптимизации способа получения рекомбинантных субъединиц А и В шигатоксина 2-го типа (rStx2A и rStx2B).

Материалы и методы

Получение продуцентов рекомбинантных субъединиц А и В шигатоксина 2-го типа

Получение штаммов *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущих экспрессионные плазмиды pET SUMO-Stx2B и pET SUMO-Stx2A, описано авторами в предыдущей статье [17]. Вкратце, гены субъединиц шигатоксинов получали методом ПЦР-амплификации ДНК штамма *E. coli* O157:H7 (ГКПМ-Оболensk, №6098) и клонировали в экспрессионный вектор pET SUMO (Invitrogen). Плазмиды с генами белков интереса трансформировали в штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Клетки выращивали в аутоиндукционной питательной среде ZYM-5052 при 25°C в течение 24 ч. В результате хроматографической очистки получили rStx2A и rStx2B. Выход с 1 л культуры составлял около 1 и 2 мг соответственно.

Дополнительно плазида pET SUMO-Stx2A была трансформирована методом электропорации в штамм NiCo21(DE3) (NEB).

Полноразмерный ген А-субъединицы Stx2 в данном исследовании был также получен методом ПЦР-амплификации ДНК штамма *E. coli* O157:H7 (№6098). Для реакций использовали высокоточную ДНК-полимеразу Phusion Hot Start II (Thermo Fisher Scientific, США) и в первом случае праймеры Stx2A_LIC51F (5'-GGTGATGATGATGACAAGCGGGAGTTTACGATAGACTTT-3') и Stx2A_LIC51R (5'-GGAGATGGGAAGTCATATTTACCGTTGTATATAAAAAC-3') для клонирования в вектор pLATE (Thermo Scientific) по технологии безлигазного клонирования; во втором случае – праймеры Stx2ANcoF (5'-ATATCCATGGGTCGGGAGTTTACGATAGACTTT-3') и Stx2AXhoR (5'-TTAACTCGAGTTTACCGTTGTATATAAAAAC-3') для клонирования в вектор pET-22b(+) (Novagen) по сайтам NcoI/XhoI согласно протоколу, указанному в руководстве. Параметры амплификации в обеих реакциях были следующими: первоначальная денатурация в течение 1 мин при 98°C, далее 30 циклов: 10 с при 98°C, 15 с при 58°C и 1 мин при 72°C; финальная элонгация длилась 2 мин. Продукты реакций очищали при помощи микроцентрифужных колонок QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Плазмиды методом трансформации вводили в электрокомпетентные клетки *E. coli* DH12S. Бактериальные колонии, выросшие на селективной питательной среде с ампициллином (Amp, 100 мкг/мл), подвергали скринингу на наличие вставки методом ПЦР. Амплификацию проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы и прямого праймера, ожидающегося в области T7-промотора T7forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), и соответствующих вставке ген-специфических обратных праймеров: для

Таблица 1. Характеристика полученных штаммов-продуцентов субъединиц шигатоксина 2-го типа *E. coli*
 Table 1. Characteristics of the obtained strains producing subunits of Shiga toxin type 2 *E. coli*

№	Штамм / Strain	Плазида / Plasmid	Ген белка / Protein gene	Антибиотик для селекции / Antibiotic for selection
1	NiCo21(DE3)	pET SUMO	stx2A	Канамицин / Kanamycin
2		pET-22b(+)	stx2A	Ампициллин / Ampicillin
3		pLATE51	stx2A	Ампициллин / Ampicillin
4	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS	pET SUMO	stx2A	Канамицин, хлорамфеникол / Kanamycin, Chloramphenicol
5		pET-22b(+)	stx2A	Ампициллин, хлорамфеникол / Ampicillin, Chloramphenicol
6		pLATE51	stx2A	Ампициллин, хлорамфеникол / Ampicillin, Chloramphenicol
7	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS	pET SUMO	stx2B	Канамицин, хлорамфеникол / Kanamycin, Chloramphenicol

штаммов с плазмидой pLATE – LIC Reverse Sequencing primer (5'- GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3), для штаммов с плазмидой pET-22b(+) – Stx2ANcoF, при следующих условиях: первоначальная денатурация в течение 3 мин при 95°C с последующими 23 циклами по 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. По результатам анализа отбирали клоны, которые использовали при проведении дальнейшей работы.

Для подтверждения соответствия нуклеотидных последовательностей гену белка Stx2A и их правильной ориентации в векторах плазмиды отправляли на секвенирование (ЗАО «Евроген Ру», Москва, РФ). Сконструированные плазмиды назвали pLATE-Stx2A и pET-22b(+)-Stx2A. Полученные векторы экспрессии, несущие ген белка Stx2A, трансформировали в экспрессионные штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen) и NiCo21(DE3).

Краткая характеристика всех полученных продуцентов представлена в табл. 1.

Таким образом, для экспрессии субъединиц шигатоксинов 2-го типа *E. coli* в нашей лаборатории было получено 6 продуцентов Stx2A и 1 продуцент Stx2B.

Культивирование и экспрессия белка

Штаммы NiCo21(DE3) и *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущие экспрессионные плазмиды pLATE51-stx2A, pET-22b(+)-stx2A, pET SUMO-stx2A, а также штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущие экспрессионную плазмиду pET SUMO-stx2B, высевали на ночь на твердую агаризованную среду с соответствующими антибиотиками (табл. 1) в рабочей концентрации (Kan – 30 мкг/мл; Amp – 100 мкг/мл; Cam – 25 мкг/мл). Единичные колонии петлей переносили в жидкую среду 2xYT, содержащую 0,1% глюкозы и соответствующие штам-

мам и плазмидам антибиотики, и инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Инокуляты из пробирок со штаммами-продуцентами Stx2A вносили в соответствующие пробирки на 50 мл, содержащие 5 мл свежей среды, до OD600 0,01–0,03 (OD600 – оптическая плотность суспензии при $\lambda = 600$ нм). Культивирование осуществляли при вращении на ротационном шейкере (200 об./мин) при 37°C. При достижении OD600 ~0,9 охлаждали пробирки с продуцентами до комнатной температуры и добавляли индуктор – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) – в разной концентрации: 100, 10 и 1 мкМ/мл. Дальнейшее наращивание проводили при пониженных температурах: 30, 25 и 20°C. Отбирали пробы клеток из всех образцов Stx2A до добавления индуктора и через 2 и 16 ч после введения в среду ИПТГ. Осадки из 200 мкл культуры лизировали в буфере (50 мМ трис pH 8, 50 мМ хлорида натрия, 0,2% тритон x-100, 1 мМ дитиотриетол, 0,1 мг/мл лизоцим) и анализировали в восстанавливающих условиях методом вертикального электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ) с окрашиванием ку-массы R-250.

Суточную культуру штамма-продуцента Stx2B использовали для инокуляции в свежую питательную среду до ~0,01–0,03 OD600. Культивирование Stx2B осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих по 100 мл питательной среды в каждой, при вращении на ротационном шейкере (200 об./мин) при 37°C до достижения логарифми-

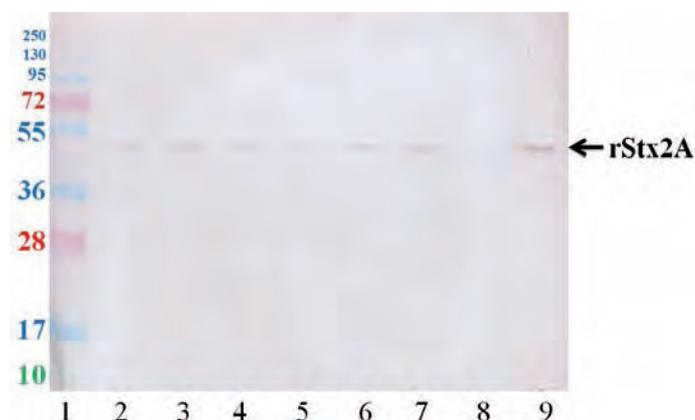


Рис. 1. Анализ синтеза Stx2A в штамме *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с плазмидой pET SUMO в среде 2xYT при различных условиях культивирования через 16 ч после добавления индуктора. Электрофорез лизатов клеток в 12%-м ПААГ в восстанавливающих условиях. Иммуноблот с мышинными МКА против His-Tag. Стрелкой указана рассчитанная с помощью программы молекулярная масса целевого белка.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – 30°C, 100 мкМ ИПТГ; 3 – 30°C, 10 мкМ ИПТГ; 4 – 30°C, 1 мкМ ИПТГ; 5 – 25°C, 100 мкМ ИПТГ; 6 – 25°C, 10 мкМ ИПТГ; 7 – 25°C, 1 мкМ ИПТГ; 8 – 20°C, 100 мкМ ИПТГ; 9 – 20°C, 10 мкМ ИПТГ.

Fig. 1. Analysis of Stx2A synthesis in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS strain with pET SUMO plasmid in 2xYT medium under different cultivation conditions 16 h after addition of the inducer. Electrophoresis of cell lysates in 12% PAGE under reducing conditions. Immunoblot with mouse MAbs against His-Tag. The arrow indicates the molecular weight of the target protein calculated using the program.

Lanes: 1 – PageRuler Prestained Plus Protein Ladder molecular weight marker; 2 – 30°C, 100 μ M IPTG; 3 – 30°C, 10 μ M IPTG; 4 – 30°C, 1 μ M IPTG; 5 – 25°C, 100 μ M IPTG; 6 – 25°C, 10 μ M IPTG; 7 – 25°C, 1 μ M IPTG; 8 – 20°C, 100 μ M IPTG; 9 – 20°C, 10 μ M IPTG.

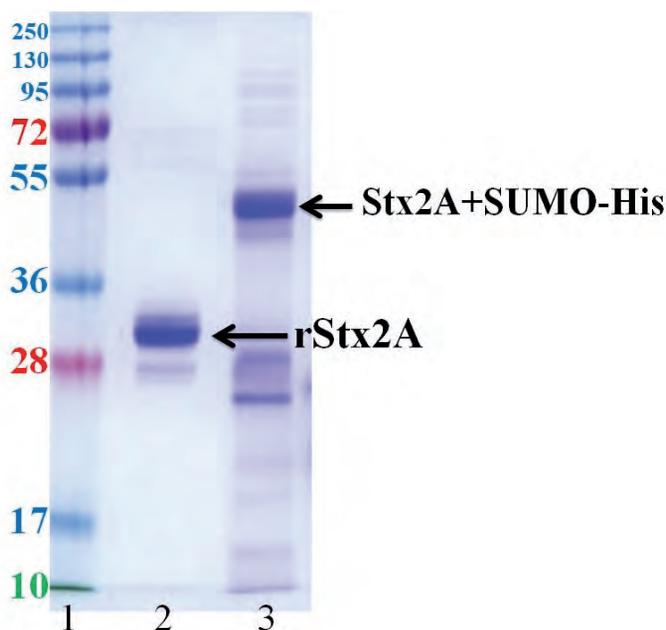


Рис. 2. Результаты хроматографической очистки А-субъединицы шигатоксина 2-го типа. Электрофорез образцов в 12%-м ПААГ в восстанавливающих условиях. Стрелками указаны молекулярные массы целевого белка в составе химерного продукта и после удаления слитого белка, рассчитанные с помощью программы.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – рекомбинантный Stx2A после разрезания SUMO-протеазой (33 кДа), 3 мкг; 3 – рекомбинантный Stx2A в составе химерного продукта (Stx2A + SUMO-His, 46 кДа), 3 мкг.

Fig. 2. Results of chromatographic purification of the A-subunit of Shiga toxin type 2. Electrophoresis of samples in 12% PAGE under reducing conditions. Arrows indicate the molecular weights of the target protein as part of the chimeric product and after removal of the fusion protein, calculated using the program.

Lanes: 1 – molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – recombinant Stx2A after cleavage with SUMO protease (33 kDa), 3 μ g; 3 – recombinant Stx2A as part of the chimeric product (Stx2A + SUMO-His, 46 kDa), 3 μ g.

ческой фазы (~0,6 OD600). Далее охлаждали колбы с продуцентами до комнатной температуры и добавляли ИПТГ в различных концентрациях. Дальнейшее наращивание проводили при пониженных температурах. Отбирали пробы клеток из образцов штамма-продуцента Stx2B до добавления индуктора и через 2 и 16 ч после введения в среду ИПТГ. Условия культивирования после введения индуктора представлены в табл. 2.

Отобранные осадки из 200 мкл культуры также лизировали в 100 мкл буфера для лизиса и анализировали в восстанавливающих условиях методом вертикального электрофореза в 12%-м или 15%-м ПААГ. Собранные центрифугированием со 100 мл культуры осадки клеток замораживали при -80°C для хранения.

Анализ синтеза целевых белков

Анализ синтеза целевых белков проводили методом иммуноблоттинга. Для этого проводили электрофорез лизатов (по 5 мкл/лунку) в восстанавливающих условиях в 12%-м ПААГ по методу Лэммли. Белки из гелей переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью полуэлектридной ячейки для переноса TransBlot SD SemiDry (Bio-Rad) по стан-

Таблица 2. Условия культивирования штамма-продуцента Stx2B в среде 2xYT
 Table 2. Cultivation conditions of the Stx2B producer strain in 2xYT medium

№	Штамм и плаزمид / Strain and plasmid	Концентрация антибиотика, мкг/мл / Antibiotic concentration, µg/ml	Температура экспрессии, °С / Expression temperature, °C	Концентрация ИПТГ, мкМ/мл / IPTG concentration, µM/ml	Время, ч / Time, h
1	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS с плазмидой pET SUMO	Kan30, Cam25	30	1	2; 16
2			30	10	2; 16
3			25	1	2; 16
4			25	10	2; 16
5			25	100	2; 16
6			20	10	2; 16
7			20	100	2; 16

дартному протоколу. Мембраны блокировали в 1%-м молоке. После отмывки мембраны инкубировали с первичными антителами в концентрации 3 мкг/мл. Для контроля синтеза белка Stx2A использовали мышинное моноклональное антитело (МКА) против гистидина (6x-His-Tag Monoclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific, США). Для контроля синтеза белка Stx2B использовали коммерческое гуманизованное МКА уртоксазумаб (ТМА-15) [18, 19]. После инкубации мембраны производили отмывку от несвязавшихся антител. Для детекции анти-Stx2A-МКА и анти-Stx2B-МКА использовали вторичные антитела, связанные с пероксидазой хрена: козье антимышиное (в разведении 1:500) и козье против γ -цепи иммуноглобулина G человека (в разведении 1:5000) соответственно. Визуализацию осуществляли с помощью реактива 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид (Sigma).

Очистка целевых белков и их характеристика

Оптимальный протокол индукции, подобранный в ходе исследования, использовали для культивирования штаммов-продуцентов целевых белков. Биомассу, собранную центрифугированием с 1 л жидкой культуры клеток, замораживали для хранения при 80°C.

Бактериальные осадки ресуспендировали в буфере А (25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 10мМ имидазола, 0,2% твин-20 и 2% глицерина) и лизировали по стандартному протоколу с дальнейшей мягкой обработкой ультразвуком (Bandelin SONOPULS HD 2200, Германия) на льду до полного разрушения клеток. Клеточный дебрис осаждали на центрифуге при 48000 g в течение 15 мин при 4°C.

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

Осветленный лизат наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку с сорбентом (Seraph Technologies, Китай). Проскок собирали для анализа. Белки элюировали буфером Б состава: 25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 200 мМ имидазола, 0,2% твин-20 и 2% глицерина. Полученный образец подвергали диализу против буфера А в течение ночи для удаления имидазола из раствора. Полученный раствор белка инкубировали с протеазой SUMO (1 мкг/мл и 10X SUMO Protease Buffer) и DTT (дитиотреитол 1 мкг / мл) при 30°C в течение 2-3 ч и повторно наносили на колонку с сорбентом Polar MC60-Ni Excel. Целевые белки содержались в проскоке. Сорбированный на колонке остаток элюировали буфером Б. На каждом этапе отбирали пробы для анализа.

Далее проводили гель-фильтрационную очистку на уравновешенной фосфатно-солевым буфером (ФСБ) колонке Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare, США) для замены буфера и удаления низкомолекулярных веществ. На основании данных электрофореза в 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях определяли фракции, в которых содержались белки интереса, и объединяли растворы.

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

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

Для оценки чистоты полученных рекомбинантных белков проводили электрофорез в 12%-м и 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

Масс-спектрометрический анализ белков

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

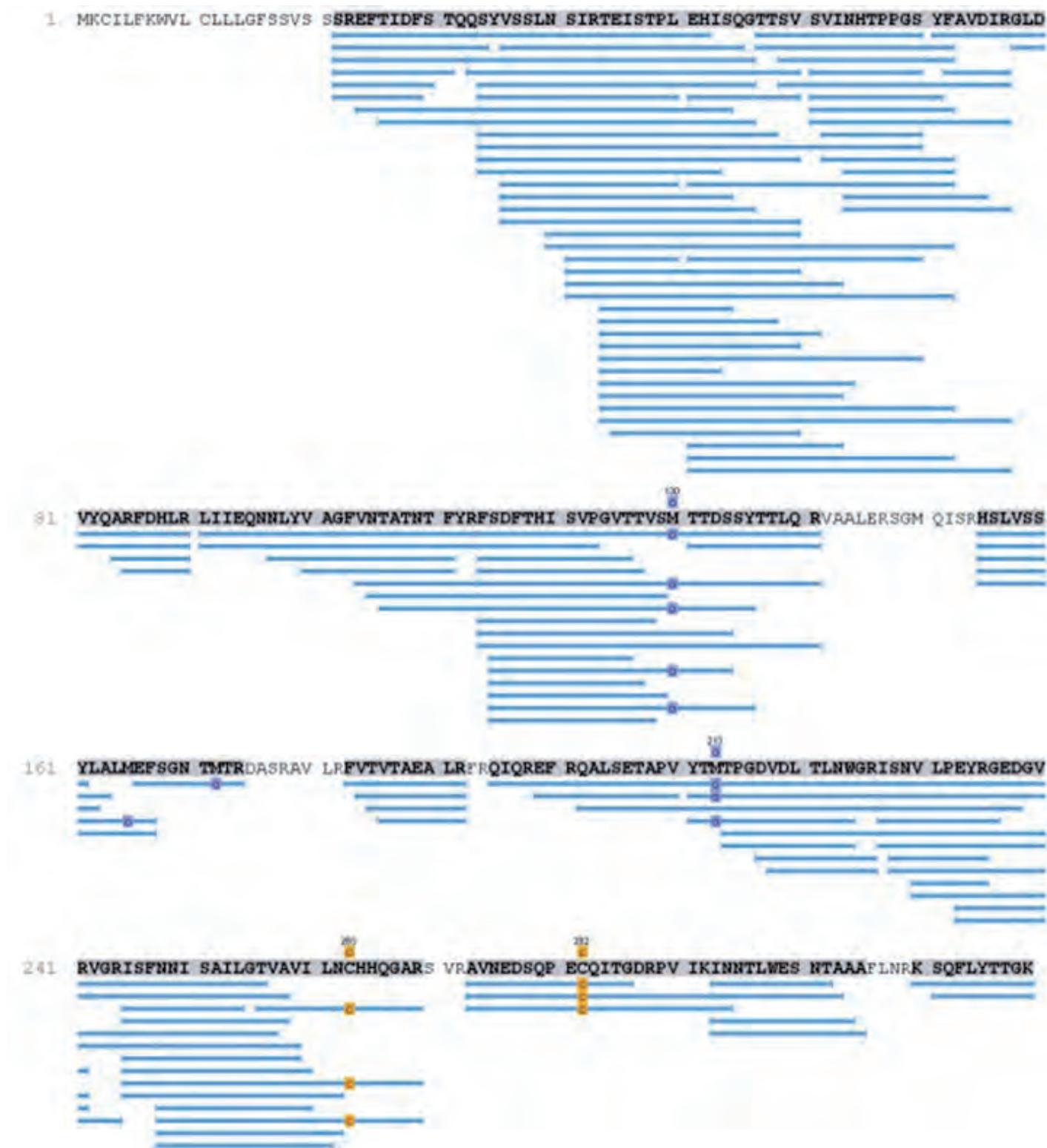


Рис. 3. Идентификация методом масс-спектрометрического анализа с использованием программного обеспечения PEAKS Studio. Синим цветом на рисунке с последовательностью белка обозначены идентифицированные пептиды.

Fig. 3. Identification by mass spectrometric analysis using PEAKS Studio software. The identified peptides are shown in blue in the figure with the protein sequence.

Функциональная активность рекомбинантных субъединиц и оценка цитотоксичности Stx2

Исследования функциональной активности рекомбинантных субъединиц и цитотоксичности полученного Stx2 проводили на клеточной линии Vero в MTT-тесте [20]. Для опреде-

ления CD50 холотоксина в пробирке соединяли рекомбинантные субъединицы Stx2A и Stx2B, причем Stx2B всегда добавляли в 5-молярном превышении по отношению к Stx2A (для сохранения соотношения AB5). В культуральные планшеты с клеточной линией Vero, содержащие $1 \cdot 10^4$ клеток/

лунку, добавляли Stx2A, Stx2B и Stx2 в различных концентрациях: 240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,7; 1,8 нг/мл. В качестве контроля использовали лунки со средой без токсина (100% жизнеспособных клеток, контроль сравнения K1) и лунки с добавлением мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) до конечной концентрации 0,024% (100% нежизнеспособных клеток, контроль сравнения K2). Все исследуемые точки дублировали в 6 повторностях. Подготовленные культуральные планшеты оставляли на 72 ч в CO₂-инкубаторе. Через 72 ч инкубации в лунки добавляли по 10 мкл стокового раствора МТТ (тиазолил синий тетразолий бромид) и инкубировали еще 4 ч. Затем аккуратно убирали культуральную среду с МТТ и лизировали клеточный слой добавлением 200 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США). Для полного лизиса клеток и равномерного растворения кристаллов формазана планшеты помещали на платформу шейкера TS-100С (BioSan, Латвия) и качали 10 минут 500 об./мин при комнатной температуре. Оптическую плотность клеточного лизата измеряли при длине волны 540 нм (OD540) на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США). Процент выживших клеток после добавления Stx определяли по формуле:

$$\text{Процент выживших клеток} = \frac{\text{ОП}_{\text{ср. опытных лунок}}}{\text{ОП}_{\text{ср. контрольных лунок (K1-K2)}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где

ОП_{ср. опытных лунок} – это средняя (для 6 повторностей) оптическая плотность лунок с исследуемыми образцами;

ОП_{ср. контрольных лунок} – разница оптической плотности контрольных лунок:

K1 – контроль сравнения, 100% жизнеспособных клеток;

K2 – контроль сравнения, 100% нежизнеспособных клеток.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина 2-го типа

Для конструирования оптимального продуцента субъединицы А шигатоксина 2-го типа использовали 2 штамма: NiCo21(DE3) и *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS.

В геноме клеток коммерческого штамма NiCo21(DE3) инактивированы гены протеолитических ферментов *lon* (цитоплазматическая протеаза) и *ompT* (периплазматическая протеаза), что в нашем эксперименте предотвращает возможную протеолитическую деградацию синтезируемого Stx2A-полипептида.

Клетки штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS содержат тРНК для кодонов AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, которые редко используются в *E. coli* дикого типа, что обеспечивает усиление экспрессии гетерологичных белков. Также штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS содержит плазмиду pLysS, которая продуцирует лизоцим фага T7, дополнительно ингибирующий транскрипцию T7-управляемых гетерологичных генов, что задерживает синтез токсичных для клеток-продуцентов белков до начала индукции.

Поскольку Stx2A является токсичным белком для клеток хозяина (*E. coli*), базальная экспрессия гена может привести к нестабильности плазмиды и/или гибели клеток-продуцен-

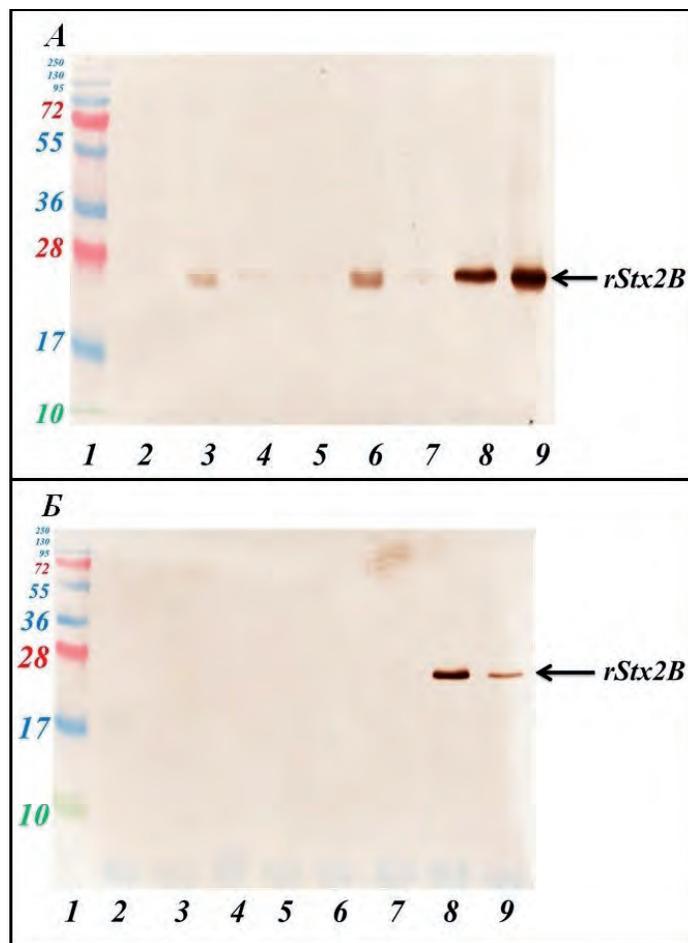


Рис. 4. Анализ синтеза Stx2B, слитого с SUMO-белком, в клетках *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS при различных условиях культивирования через 2 (А) и 16 ч (Б) после добавления индуктора. Электрофорез лизатов клеток в 12%-м ПААГ в невозстанавливающих условиях. Иммуноблот с коммерческим гуманизированным МКА TMA-15 (уртоксазумаб), специфичным к Stx2B.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – контроль, до добавления IPTG; 3 – 30°C, 1 мкМ ИПТГ; 4 – 25°C, 1 мкМ ИПТГ; Дорожка 5 – 30°C, 10 мкМ ИПТГ; 6 – 25°C, 10 мкМ ИПТГ; 7 – 20°C, 10 мкМ ИПТГ; 8 – 25°C, 100 мкМ ИПТГ; 9 – 20°C, 100 мкМ ИПТГ.

Fig. 4. Analysis of the synthesis of Stx2B fused with SUMO protein in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS cells under different cultivation conditions 2 (A) and 16 h (B) after the addition of the inducer. Electrophoresis of cell lysates in 12% PAGE under non-reducing conditions. Immunoblot with commercial humanized mAb TMA-15 (urtoxazumab), specific for Stx2B.

Lanes: 1 – molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – control, before the addition of IPTG; 3 – 30°C, 1 μM IPTG; 4 – 25°C, 1 μM IPTG; Lane 5 – 30°C, 10 μM IPTG; 6 – 25°C, 10 μM IPTG; 7 – 20°C, 10 μM IPTG; 8 – 25°C, 100 μM IPTG; 9 – 20°C, 100 μM IPTG.

тов. Для решения данной проблемы эффективно использовать один из плазмидных векторов, рекомендованных для получения токсичных белков. При создании векторов экспрессии наш выбор остановился на трех вариантах: pET SUMO, pET-22b(+), pLATE.

На базе двух штаммов *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с NiCo21(DE3) и с использованием трех экспрессионных векторов pET SUMO, pET-22b(+), pLATE было сконструировано 6 продуцентов Stx2A. Для получения высокого выхода целевого белка подбирали температурный режим (30, 25 и 20°C),

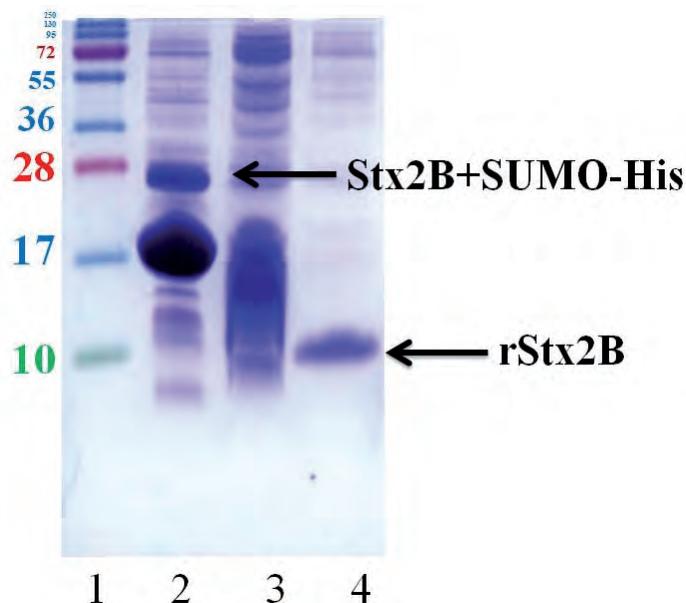


Рис. 5. Результаты хроматографической очистки В-субъединицы шигатоксина 2-го типа. Электрофорез образцов в 15%-м ПААГ в восстанавливающих условиях. Стрелками указаны молекулярные массы целевого белка в составе химерного продукта и после удаления слитого белка, рассчитанные с помощью программы.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – рекомбинантный Stx2B в составе химерного продукта (Stx2A+ SUMO-His, 21 кДа), 3 мкг; 3 – элюат после разрезания, содержащий SUMO-His (13 кДа); 4 – рекомбинантный Stx2B после разрезания SUMO-протеазой (8 кДа), 3 мкг.

Fig. 5. Results of chromatographic purification of the B-subunit of Shiga toxin type 2. Electrophoresis of samples in 15% PAGE under reducing conditions. Arrows indicate the molecular weights of the target protein in the chimeric product and after removal of the fusion protein, calculated using the program.

Lanes: 1 – molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – recombinant Stx2B in the chimeric product (Stx2A+ SUMO-His, 21 kDa), 3 µg; 3 – eluate after cleavage, containing SUMO-His (13 kDa); 4 – recombinant Stx2B after cleavage with SUMO protease (8 kDa), 3 µg.

концентрацию индуктора (100, 10 и 1 мкМ) и продолжительность культивирования штаммов-продуцентов (2, 16 ч).

После культивирования штаммов-продуцентов Stx2A при разных условиях было отобрано и проанализировано методами электрофореза 108 образцов. Однако после окрашивания гелей не наблюдалось полос на уровне теоретически ожидаемой молекулярной массы целевого продукта, что может свидетельствовать о низкой концентрации целевого белка или полном его отсутствии. Поэтому дополнительно мы использовали иммуноблоттинг, который является более чувствительным методом выявления специфического белка. Согласно расчетам, выполненным с использованием компьютерных программ (<https://web.expasy.org/protparam/>), целевой белок, находящийся в составе химерного продукта (Stx2A+SUMO-His), должен иметь молекулярную массу ~46 кДа, а во всех остальных случаях – ~33 кДа. В результате иммуноблоттинга было установлено, что Stx2A содержится в лизатах штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с плазмидой pET SUMO-stx2A в составе химерного продукта Stx2A+SUMO-His (рис. 1). В остальных образцах белок Stx2A не выявили.

Также анализ результатов иммуноблоттинга позволил выявить наиболее оптимальные условия получения rStx2A в

штамме *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущем плазмиду pET SUMO. На основании сравнительного исследования было выявлено, что наибольшее количество Stx2A наблюдается в образце №8, культивируемом при условиях 20°C, 10 мкМ ИПТГ, через 16 ч после добавления индуктора (рис. 1, дорожка 9).

Штамм-продуцент А-субъединицы шигатоксина *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS наращивали по выбранной стратегии культивирования, бактериальные осадки лизировали и проводили металл-хелатную хроматографическую очистку. После гидролиза химерного продукта, катализируемого SUMO-протеазой, получили белок с молекулярной массой ~33 кДа, что соответствует молекулярной массе Stx2A. Результаты хроматографической очистки представлены на рис. 2.

Конечный выход Stx2A составил 1,5 мг с литра, что сопоставимо с данными других исследователей [11–15]. Чистота белка, проанализированная с помощью программного обеспечения Gel-Pro Analyzer, составляла 90%.

Верификацию белка Stx2A проводили с использованием масс-спектрометрического анализа. В результате анализа был определен 151 пептид белка субъединицы А с суммарным покрытием последовательности белка 84% (рис. 3). Пептидов, соответствующих последовательности субъединицы В, обнаружено не было.

Для идентификации белка мы брали содержащую лидерный пептид последовательность Stx2A из базы данных. Полученный нами белок не содержит лидерного пептида, поэтому данный фрагмент не обнаруживается в образце. Таким образом, суммарное покрытие относительно целевой последовательности рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина 2-го типа составляет 90%.

Получение рекомбинантной В-субъединицы шигатоксина 2-го типа

На следующем этапе мы получили В-субъединицу Stx2. Для этого использовали штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущий экспрессионную плазмиду pET SUMO-Stx2B. При культивировании штамма-продуцента Stx2B в среде 2xYT при разных условиях было отобрано и проанализировано 14 индуцированных образцов. Согласно расчетам, произведенным с помощью компьютерной программы (<https://web.expasy.org/protparam/>), молекулярная масса белка интереса, находящегося в составе химерного продукта (Stx2B+SUMO-His), должна составлять 21 кДа. Поскольку электрофорез лизатов клеток-продуцентов не демонстрировал четкого различия интенсивности окраски белковых полос, мы использовали иммуноблоттинг для выявления Stx2B в образцах.

В результате анализа с использованием коммерческого МКА был выявлен белок, соответствующий по молекулярной массе Stx2B+SUMO-His (рис. 4).

В результате иммуноблоттинга было установлено, что Stx2B содержится в двух образцах уже через 2 ч (рис. 4А) и практически во всех образцах через 16 ч (рис. 4Б) после индукции, причем наибольшее количество целевого белка обнаруживалось в образце №7 (20°C, 100 мкМ ИПТГ) через 16 ч после добавления индуктора (дорожка 9).

Таким образом, в эксперименте было установлено, что для полученного штамма-продуцента наиболее оптимальны-

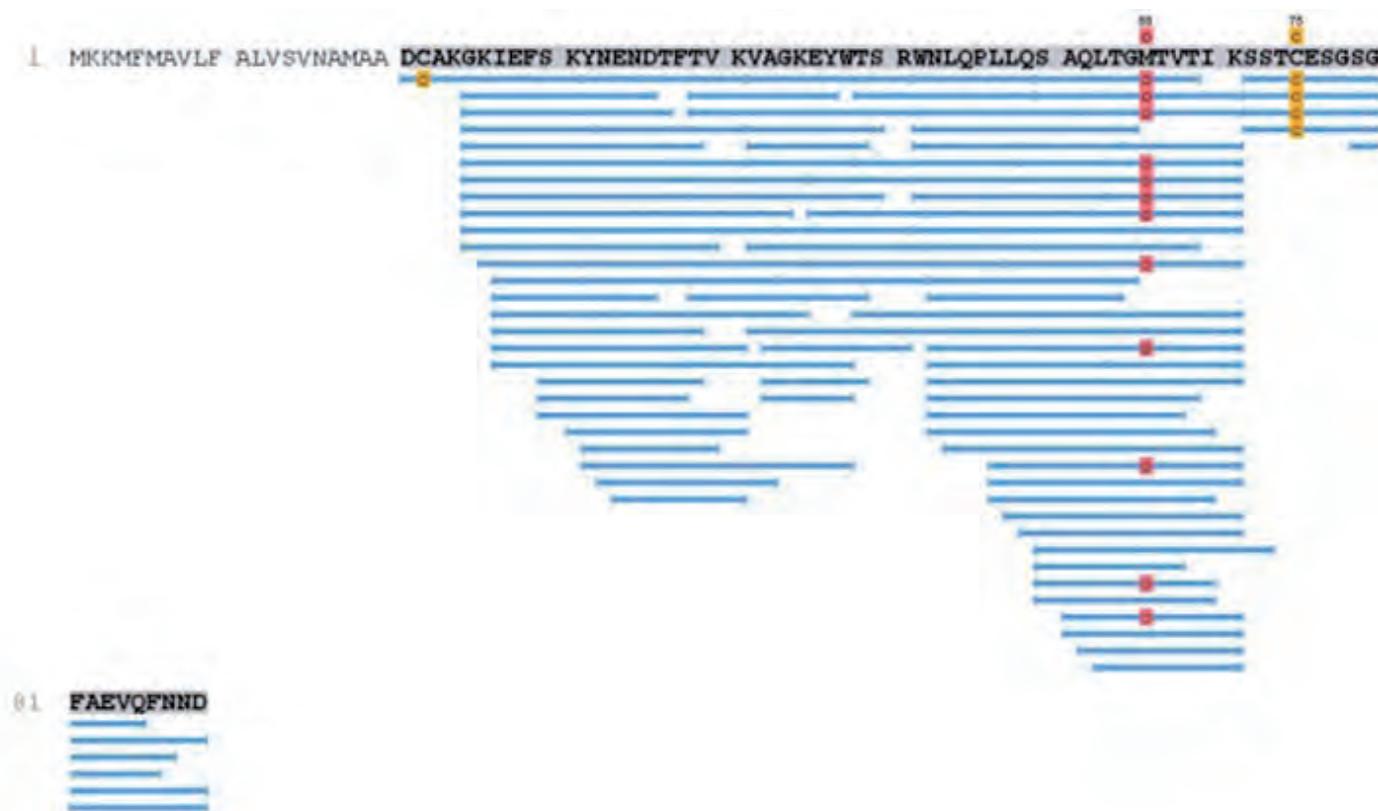


Рис. 6. Идентификация Stx2B методом масс-спектрометрического анализа с использованием программного обеспечения PEAKS Studio. Синим цветом на рисунке с последовательностью белка обозначены идентифицированные пептиды.

Fig. 6. Identification of Stx2B by mass spectrometric analysis using PEAKS Studio software. The identified peptides are shown in blue in the protein sequence figure.

ми условиями для синтеза В-субъединицы шигатоксина 2-го типа являются снижение температуры инкубирования до 20°C и увеличение времени до 16 ч при использовании ИПТГ в концентрации 100 мкМ. Методику культивирования данного образца использовали в дальнейшем для получения В-субъединицы шигатоксина.

Штамм-продуцент *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с экспрессионной плазмидой pET SUMO-Stx2B культивировали по выбранной стратегии экспрессии, биомассу с 1 л жидкой культуры лизировали и очищали с помощью металл-хелатной хроматографии. Выделенный белок с молекулярной массой 21 кДа подвергали протеолизу с использованием SUMO-протеазы, в результате в проскоке обнаруживался белок с молекулярной массой ~8 кДа, что соответствует ожидаемой молекулярной массе Stx2B. Результаты очистки рекомбинантной В-субъединицы шигатоксина 2-го типа представлены на рис. 5.

В результате конечный выход Stx2B составил 4 мг с литра. Чистота белка, проанализированная с помощью программного обеспечения Gel-Pro Analyzer, составляла 85%.

Верификацию белка Stx2B проводили масс-спектрометрическим анализом. В результате анализа были определены 69 пептидов белка субъединицы В с суммарным покрытием последовательности белка 78% (рис. 6).

Пептидов, соответствующих последовательности субъединицы А, обнаружено не было. Так как полученный нами rStx2B не содержит лидерного пептида, который представлен на последовательности, взятой из базы данных, он не

обнаруживается в образце. В связи с вышесказанным суммарное покрытие относительно целевой последовательности В-субъединицы составляет 100%.

Оценка функциональной активности rStx2A и rStx2B и цитотоксичности холотоксина

Функциональным рецептором шигатоксина 2-го типа является нейтральный гликофинголипид глоботриацоилцерамид (Gb3), локализующийся на цитоплазматических мембранах эндотелиальных клеток почек. В связи с этим клеточную линию Vero использовали для определения функциональной активности и цитотоксичности rStx2A и rStx2B. Результаты исследования представлены на рис. 7.

В опыте белки Stx2A и Stx2B по отдельности не оказывали цитотоксического действия на культуру Vero. Однако воздействие холотоксина (соединение субъединиц *in vitro*) вызывало дозозависимую гибель клеток Vero. Значение 50%-й цитотоксической дозы для рекомбинантного шигатоксина 2-го типа в эксперименте составляло 15 нг/мл.

В первоначальных исследованиях по получению шигатоксинов полноразмерные белки синтезировались с выделением в культуральную жидкость [15], но это затрудняет выделение белка при получении его в больших объемах, а также не исключает гибели продуцентов в процессе экспрессии и не приводит к высокому выходу продукта. В России опубликован патент [21], в котором говорится о получении токсина при внесении точечных мутаций с синтезом белка в периплазму. Однако периплазматическое пространство занима-

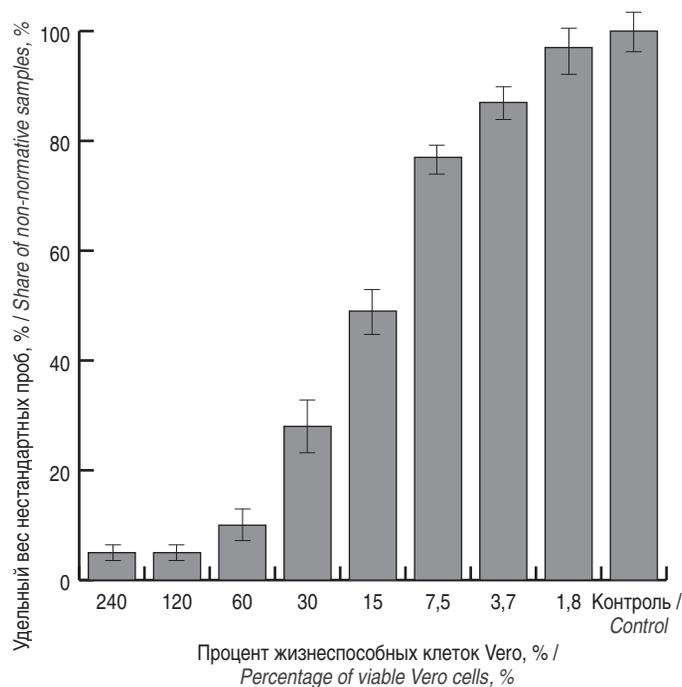


Рис. 7. Цитотоксическое действие Stx2 на клетки Vero.
Fig. 7. Cytotoxic effect of Stx2 on Vero cells.

ет малую часть от объема клетки, поэтому выход получается невысоким. В связи с этим для увеличения выхода оптимально получать субъединицы токсина отдельно друг от друга при синтезе в цитоплазму. Чаухан и соавт. [11] сообщали о получении А-субъединицы шигатоксина 2-го типа, но в их работе белок выделяется в виде телец включения и приходится проводить ренатурацию белка, что может сказываться на биологической активности продукта.

Наши исследования показали, что продукция белка в штаммах, несущих плазмиды pET-22b(+)-stx2A и pLATE51-stx2A, и штамме NiCo21(DE3) с плазмидой pET SUMO-stx2A является неудачной. Единственным штаммом, который обеспечивал синтез А-субъединицы шигатоксина 2-го типа, был *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, трансформированный плазмидой pET SUMO-stx2A. Таким образом, целевой белок был синтезирован в составе химерного продукта. За счет этого обеспечивался правильный фолдинг и белок удалось выделить в растворимой форме. Аналогичный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, трансформированный плазмидой pET SUMO-stx2B, использовали для получения рекомбинантной В-субъединицы шигатоксина 2-го типа.

Благодаря удалению фрагмента SUMO-His конечные А- и В-субъединицы шигатоксина 2-го типа получились без дополнительных аминокислотных последовательностей, что должно способствовать их правильной сборке в холотоксин, а также предотвращать перекрытие активных центров для сохранения функциональной активности.

Учитывая тот факт, что неестественно высокие скорости синтеза белка могут приводить к отсутствию дисульфидных связей и неправильной укладке белка, что, в свою очередь, влечет деградацию белка или образование телец включения, мы осуществляли подбор условий культивирования штаммов-продуцентов. Для решения данной проблемы бактерии наращивали при температуре индукции, пониженной до 30, 25 или 20°C, и вводили ИПТГ в различной

концентрации с одновременным увеличением времени индукции.

В результате анализа влияния различных факторов на продукцию белка были установлены оптимальные условия для получения Stx2A и Stx2B. Помимо снижения деградации белка, это также позволило повысить конечную биомассу клеток.

Клетки Vero использовали для анализа клеточной цитотоксичности, поскольку эти клетки экспрессируют высокий уровень рецептора Gb3, который связывается с шигатоксинами. В микротесте rStx2A и rStx2B проявляли цитотоксическую активность при образовании холотоксина *in vitro*, что подтверждает их функциональную активность.

Таким образом, нами были подобраны условия по оптимизации способа получения рекомбинантных субъединиц А и В шигатоксина 2-го типа (rStx2A и rStx2B). Наиболее оптимальной методикой получения субъединицы А шигатоксина 2-го типа является использование штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущего экспрессионную плазмиду pET SUMO, при культивировании в среде 2xYT наиболее продуктивно наращивать клетки до OD600 ≈ 1 (для набора максимальной биомассы) и инкубировать при 20°C после добавления 10 мкМ ИПТГ в течение 16 ч.

Субъединица В шигатоксина 2-го типа успешно продуцировалась в штамме *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущем экспрессионную плазмиду pET SUMO, в среде 2xYT. Увеличение конечного выхода белка обеспечивалось при культивировании при сниженной до 20°C температуре после добавления ИПТГ в концентрации 100 мкМ, экспрессия белка продолжалась в течение 16 ч.

Установленный в ходе исследования алгоритм получения субъединиц использовали для получения целевого белка. Конечный выход составлял для Stx2A 1,5 мг с литра, для Stx2B – 4 мг с литра. Идентичность рекомбинантных белков Stx2A и Stx2B подтвердили методом масс-спектрометрии. В ходе данной работы была показана функциональная активность полученных белков в форме холотоксина в микротесте МТТ по определению цитотоксичности.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Menge C. Molecular Biology of *Escherichia coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. *Toxins* (Basel). 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345
- Basu D, Tumer NE. Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins* (Basel). 2015 Apr 29;7(5):1467-85. DOI: 10.3390/toxins7051467

- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008 Oct;23(10):1749-60. DOI: 10.1007/s00467-008-0935-6
- Biernbaum EN, Kudva IT. AB5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned from Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2022 Jan 16;14(1):62. DOI: 10.3390/toxins14010062
- Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
- Lee MS, Cherla RP, Tesh VL. Shiga toxins: intracellular trafficking to the ER leading to activation of host cell stress responses. *Toxins (Basel)*. 2010 Jun;2(6):1515-35. DOI: 10.3390/toxins2061515
- Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J, Paton JC. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci*. 2010 Jul;35(7):411-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.02.003
- Johannes L. Shiga Toxin-A Model for Glycolipid-Dependent and Lectin-Driven Endocytosis. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 25;9(11):340. DOI: 10.3390/toxins9110340
- Sandvig K, Bergan J, Dyve AB, Skotland T, Torgersen ML. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*. 2010 Dec 15;56(7):1181-5. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.021
- Olenick JG, Wolfe AD. Shigella toxin inhibition of binding and translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol*. 1980 Mar;141(3):1246-50. DOI: 10.1128/jb.141.3.1246-1250.1980
- Chauhan V, Chaudhary D, Rao MK, Dhaked RK. Expression, Purification and Immunological Characterization of Recombinant Shiga Toxin A Subunit. *Protein Pept Lett*. 2015;22(9):844-52. DOI: 10.2174/0929866522666150707115007
- Chauhan V, Chauhan R, Sonkar P, Dhaked RK. Biochemical Characterization of *In vitro* Reconstituted Biologically Active Recombinant Shiga Toxin. *Protein Pept Lett*. 2019;26(3):227-234. DOI: 10.2174/0929866526666181228161834
- Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. *Protein Expr Purif*. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
- Tu W, Li T, Wang Q, Cai K, Gao X, Wang H. A simple method for expression and purification of Shiga toxin 1 (Stx1) with biological activities by using a single-promoter vector and native signal peptide. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016 Jul;63(4):539-45. DOI: 10.1002/bab.1398
- Huang A, de Grandis S, Friesen J, Karmali M, Petric M, Congi R, et al. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *J Bacteriol*. 1986 May;166(2):375-9. DOI: 10.1128/jb.166.2.375-379.1986
- Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 июня 2011 г. №86 (Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08).
- Шкуратова МА, Марьин МА, Рогозин ММ, Сурин АК, Коломбет ЛВ, Фирстова ВВ. Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*. *Бактериология*. 2021;6(4):30-38. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38
- Moxley RA, Francis DH, Tamura M, Marx DB, Santiago-Mateo K, Zhao M. Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins (Basel)*. 2017 Jan 26;9(2):49. DOI: 10.3390/toxins9020049
- Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, Katsuura Y, Matsumoto Y. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001 Sep 15;184(6):738-42. DOI: 10.1086/323082
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Козлов ЮВ, Лукьянов ЕВ, Захарова ЛГ. Нетоксичный рекомбинантный шига-токсин 2-го типа (Stx2). Патент RU2573924C2, бюллетень №3, опубл. 27.01.2016.

References

- Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. *Toxins (Basel)*. 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345
- Basu D, Tumer NE. Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins (Basel)*. 2015 Apr 29;7(5):1467-85. DOI: 10.3390/toxins7051467
- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008 Oct;23(10):1749-60. DOI: 10.1007/s00467-008-0935-6
- Biernbaum EN, Kudva IT. AB5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned from Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2022 Jan 16;14(1):62. DOI: 10.3390/toxins14010062
- Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
- Lee MS, Cherla RP, Tesh VL. Shiga toxins: intracellular trafficking to the ER leading to activation of host cell stress responses. *Toxins (Basel)*. 2010 Jun;2(6):1515-35. DOI: 10.3390/toxins2061515
- Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J, Paton JC. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci*. 2010 Jul;35(7):411-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.02.003
- Johannes L. Shiga Toxin-A Model for Glycolipid-Dependent and Lectin-Driven Endocytosis. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 25;9(11):340. DOI: 10.3390/toxins9110340
- Sandvig K, Bergan J, Dyve AB, Skotland T, Torgersen ML. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*. 2010 Dec 15;56(7):1181-5. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.021
- Olenick JG, Wolfe AD. Shigella toxin inhibition of binding and translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol*. 1980 Mar;141(3):1246-50. DOI: 10.1128/jb.141.3.1246-1250.1980
- Chauhan V, Chaudhary D, Rao MK, Dhaked RK. Expression, Purification and Immunological Characterization of Recombinant Shiga Toxin A Subunit. *Protein Pept Lett*. 2015;22(9):844-52. DOI: 10.2174/0929866522666150707115007
- Chauhan V, Chauhan R, Sonkar P, Dhaked RK. Biochemical Characterization of *In vitro* Reconstituted Biologically Active Recombinant Shiga Toxin. *Protein Pept Lett*. 2019;26(3):227-234. doi: 10.2174/0929866526666181228161834
- Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. *Protein Expr Purif*. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
- Tu W, Li T, Wang Q, Cai K, Gao X, Wang H. A simple method for expression and purification of Shiga toxin 1 (Stx1) with biological activities by using a single-promoter vector and native signal peptide. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016 Jul;63(4):539-45. DOI: 10.1002/bab.1398
- Huang A, de Grandis S, Friesen J, Karmali M, Petric M, Congi R, et al. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *J Bacteriol*. 1986 May;166(2):375-9. DOI: 10.1128/jb.166.2.375-379.1986
- Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated June 29, 2011 №86 (Safety of working with microorganisms of III–IV pathogenicity (hazard) groups and pathogens of parasitic diseases, Sanitary and Epidemiological Rules SP 1.3.2322-08). (In Russian).

17. Shkuratova MA, Maryin MA, Rogozin MM, Surin AK, Kolombet LV, Firstova VV. Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*. *Bacteriology*. 2021;6(4):30-38. (In Russian).
18. Moxley RA, Francis DH, Tamura M, Marx DB, Santiago-Mateo K, Zhao M. Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins (Basel)*. 2017 Jan 26;9(2):49. DOI: 10.3390/toxins9020049
19. Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, Katsuura Y, Matsumoto Y. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001 Sep 15;184(6):738-42. DOI: 10.1086/323082
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
21. Kozlov JuV, Luk'janov EV, Zakharova LG. Non-toxic recombinant shiga toxin type 2 (Stx2) 3 Patent RU2573924C2, Bull. №3, Date of publication: 27.01.2016. (In Russian).

Информация о соавторах:

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рогозин Метхун Мадибронович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Калмантаева Ольга Валериевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Maksim A. Maryin, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Methun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga V. Kalmantaeva, PhD (Biological Science), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anna E. Khllyntseva, PhD (Biological Science), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Alexey K. Surin, PhD (Physics and Mathematics Science), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Science), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Модель развития вентилятор-ассоциированной пневмонии

Пневмония, ассоциированная с вентиляцией, определяется как пневмония, которая развивается у пациента, находящегося на искусственной вентиляции легких более 48 ч через эндотрахеальную трубку. Она вызвана образованием биопленки на трубке, которая вводит патогенные микробы, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Candida albicans*, в нижние дыхательные пути пациента. В настоящее время отсутствуют точные модели развития вентилятор-ассоциированной пневмонии *in vitro*. Это значительно ограничивает понимание того, как среда внутри хозяина изменяет физиологию патогена, и эффективность стратегий профилактики или лечения вентилятор-ассоциированной пневмонии. Разработана воспроизводимая модель, имитирующая образование биопленки этих патогенов в среде, имитирующей хозяина, и показано, что полученная матрица биопленки отличается от наблюдаемой в стандартной лабораторной питательной среде. В модели патогены выращиваются на сегментах эндотрахеальной трубки в присутствии новой синтетической среды слизи вентилируемых дыхательных путей, которая имитирует среду внутри хозяина. Для характеристики системы с точки зрения состава и структуры матрицы биопленки по сравнению со стандартной лабораторной средой роста использовались ферменты, разрушающие матрицу, и криосканирующая электронная микроскопия. Как видно на примере пациентов, биопленки патогенов вентилятор-ассоциированной пневмонии в данной модели либо требовали очень высоких концентраций антимикробных препаратов для уничтожения, либо не могли быть уничтожены. Однако сочетание ферментов, разрушающих матрицу, с антимикробными препаратами значительно улучшило удаление биопленки всех патогенов. Эта модель эндотрахеальной трубки *in vitro* информирует о фундаментальной микробиологии в контексте вентилятор-ассоциированной пневмонии и имеет широкое применение в качестве скрининговой платформы для мер по борьбе с биопленкой, включая использование ферментов, разрушающих матрицу, в качестве антимикробных адьювантов.

Walsh D, Parmenter C, Bakker SE, Lithgow T, Traven A, Harrison F.

A new model of endotracheal tube biofilm identifies combinations of matrix-degrading enzymes and antimicrobials able to eradicate biofilms of pathogens that cause ventilator-associated pneumonia. Microbiology (Reading). 2024 Aug;170(8). DOI: 10.1099/mic.0.001480

Особенности состава кишечной микробиоты у пациенток с наружным генитальным эндометриозом

В.А.Пронина¹, А.Б.Гордеев¹, В.В.Муравьева¹, А.В.Скоробогатый¹, К.Н.Жигалова¹,
П.А.Денисов¹, Г.Е.Чернуха¹, Т.В.Припутневич^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

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

Эндометриоз является распространенным гормонозависимым заболеванием, ассоциированным с хроническим воспалением, этиология и патогенез которого являются предметом научных дискуссий. По результатам современных исследований, существует взаимосвязь между составом кишечной микробиоты (КМ) и эндометриозом, включая его отдельные формы.

Цель исследования – провести анализ состава КМ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ). Проведено одномоментное исследование КМ у 56 пациенток с НГЭ и 35 условно здоровых женщин, сопоставимых по возрасту. Образцы фекалий исследованы методом культуромики с посевом на расширенный спектр питательных сред и последующей видовой идентификации всех выделенных микроорганизмов с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). По результатам исследования КМ пациенток с НГЭ оказалась представлена меньшим видовым и таксономическим разнообразием, увеличением индекса *Bacillota/Bacteroidota* за счет повышения абсолютного и относительного числа факультативно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. и облигатно-анаэробных УПМ *Clostridium* spp. и снижения количества комменсальных бактерий *Weissella* spp., обладающих противовоспалительным и пробиотическим потенциалом, а также дисбаланса бактериоидов. Кроме того, отмечалось повышение частоты встречаемости и титра грамотрицательных УПМ *Citrobacter* spp., обладающих провоспалительным потенциалом за счет эндотоксина бактериальной стенки. Таким образом, КМ пациенток с НГЭ характеризуется снижением видового богатства, увеличением числа УПМ на фоне снижения бактерий-симбионтов.

Ключевые слова: эндометриоз, кишечная микробиота, культуромика, MALDI-TOF масс-спектрометрия

Для цитирования: Пронина В.А., Гордеев А.Б., Муравьева В.В., Скоробогатый А.В., Жигалова К.Н., Денисов П.А., Чернуха Г.Е., Припутневич Т.В. Особенности состава кишечной микробиоты у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. Бактериология. 2024; 9(3): 20–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-20-27

Features of the intestinal microbiota composition in patients with external genital endometriosis

V.A.Pronina¹, A.B.Gordeev¹, V.V.Muravieva¹, A.V.Skorobogatiy¹, K.N.Zhigalova¹,
P.A.Denisov¹, G.E.Chernukha¹, T.V.Priputnevich^{1,2}

¹V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

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

Endometriosis is a common hormone-dependent disease associated with chronic inflammation, the etiology and pathogenesis of which are the subject of scientific debate. According to the results of modern research, there is a relationship between the composition of the intestinal microbiota (IM) and endometriosis, including its individual forms.

The aim of the study was to analyze the composition of IM in patients with external genital endometriosis. A single-stage study of IM was conducted in 56 patients with endometriosis and 35 conditionally healthy women of comparable age. Faecal samples

Для корреспонденции:

Пронина Вероника Алексеевна, врач акушер-гинеколог, аспирант ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4
Статья поступила 02.04.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Veronika A. Pronina, obstetrician-gynecologist, PhD student of the V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 4 Academician Oparin str., Moscow, 117997, Russian Federation
The article was received 02.04.2024, accepted for publication 30.09.2024

were examined by culturomics with inoculation on an extended range of nutrient media and subsequent species identification of all isolated microorganisms using time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). According to the results of the study, the IM of endometriosis patients was represented by a lower species and taxonomic diversity, an increase in the *Bacillota/Bacteroidota* index due to an increase in the absolute and relative number of facultative anaerobic opportunistic pathogens *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. and obligate-anaerobic *Clostridium* spp., and a decrease in the number of commensal bacteria *Weissella* spp., which have anti-inflammatory and probiotic potential, as well as an imbalance of bacteroids. In addition, there was an increase in the frequency of occurrence and titer of gram-negative *Citrobacter* spp., which have proinflammatory potential due to bacterial wall endotoxin. Thus, the IM of patients with endometriosis is characterized by a decrease in species richness, an increase in the number of opportunistic pathogens against the background of a decrease in symbiont bacteria.

Key words: endometriosis, gut microbiota, culturomics, MALDI-TOF mass spectrometry

For citation: Pronina V.A., Gordeev A.B., Muravieva V.V., Skorobogatiy A.V., Zhigalova K.N., Denisov P.A., Chernukha G.E., Pripitnevich T.V. Features of the intestinal microbiota composition in patients with external genital endometriosis. *Bacteriology*. 2024; 9(3): 20–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-20-27

Эндометриоз является гормонозависимым заболеванием, ассоциированным с хроническим воспалением, частота встречаемости которого может достигать 18% среди женщин репродуктивного возраста [1]. Несмотря на широкую распространенность заболевания, отмечается задержка в постановке диагноза, составляющая в среднем от 6 до 10 лет [2]. Это указывает на значимость совершенствования методов диагностики эндометриоза, в т.ч. неинвазивных.

Этиология и патогенез эндометриоза остаются предметом научных дискуссий, несмотря на существование более 10 теорий его возникновения. Японские исследователи K.N.Khan et al. выдвинули гипотезу бактериального заражения, концепция которой выстроена на влиянии контаминации менструальной крови *Escherichia coli*. Ими было показано, что бактериальный эндотоксин липополисахарид (ЛПС), воздействуя опосредованно через Toll-подобные рецепторы 4-го типа, может стимулировать выработку провоспалительных цитокинов и факторов роста, тем самым способствуя развитию хронического воспаления [3]. Считается, что в патогенез эндометриоза вносит вклад эстроболом. Показано, что ряд микроорганизмов, включая *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia* spp., могут секретировать β-глюкуронидазу – фермент, способствующий деконъюгированию эстрогенов в просвете кишечника в активные формы, что создает локальную эндогенную гиперэстрогению [4, 5].

Ввиду потенциального вклада микробиоты в генез эндометриоза, а также необходимости в усовершенствовании неинвазивной диагностики заболевания ряд исследователей сделали попытку выявить значимые изменения микробного состава, характерные для эндометриоза. Однако данные литературы неоднозначны не только по полученным результатам, но также по выборке пациенток и области исследования [6–11]. Тем не менее в настоящее время изучается возможность использования информации о составе микробиоты для диагностики и терапии многих заболеваний, в т.ч. путем проведения микробиологического исследования образцов фекалий пациентов методом культуromики [12, 13]. Данные литературы свидетельствуют о том, что при эндометриозе отмечается изменение соотношения ряда микробных сообществ [6–11]. Несмотря на достаточное количество работ по изучению взаимосвязи состава микробиоты и эндометриоза, лишь единичные исследования проведены на кишечной микробиоте (КМ) человека [11]. Важно отметить, что анализ отделяемого желудочно-кишечного

тракта (ЖКТ) является одним из наиболее простых и удобных методов с точки зрения сбора материала, а диагностическая значимость образцов фекалий сопоставима с другими исследуемыми биологическими средами [14]. Изучение КМ также является обоснованным, поскольку до 85% пациенток с эндометриозом имеют различные желудочно-кишечные симптомы [15].

Таким образом, целью настоящего исследования являлось проведение анализа состава КМ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ).

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено одномоментное исследование на базе Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России в период с декабря 2021 г. по декабрь 2023 г. Основную группу составили 56 пациенток с НГЭ (средний возраст 29 (25; 36) лет, средний индекс массы тела (ИМТ) 20,05 (18,45; 21,55) кг/м²), в группу сравнения включены 35 условно здоровых пациенток (средний возраст 27 (26; 28,75) лет, средний ИМТ 21,9 (19,73; 24,13) кг/м²). Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и ИМТ (> 0,05). Критерий включения в основную группу: наличие признаков НГЭ по данным магнитно-резонансной томографии органов малого таза. Критерий включения в группу сравнения: отсутствие признаков генитального эндометриоза по данным экспертного ультразвукового исследования органов малого таза. Дополнительные критерии включения пациенток обеих групп: возраст от 18 до 45 лет; наличие информированного согласия на участие в исследовании, одобренном этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России. Критерии невключения пациенток обеих групп: невозможность сбора образцов фекалий для микробиологического исследования утром в день проводимого исследования; наличие симптомов со стороны ЖКТ, которые могли бы помешать сбору материала; менструация; прием антибактериальных или пробиотических препаратов, гормонотерапия как минимум за 3 мес. до включения в исследование. Критерии исключения для обеих групп: наличие тяжелой соматической патологии; наличие онкологических заболеваний на момент включения в исследование или в анамнезе; органические заболевания ЖКТ на момент включения в исследование или в анамнезе.

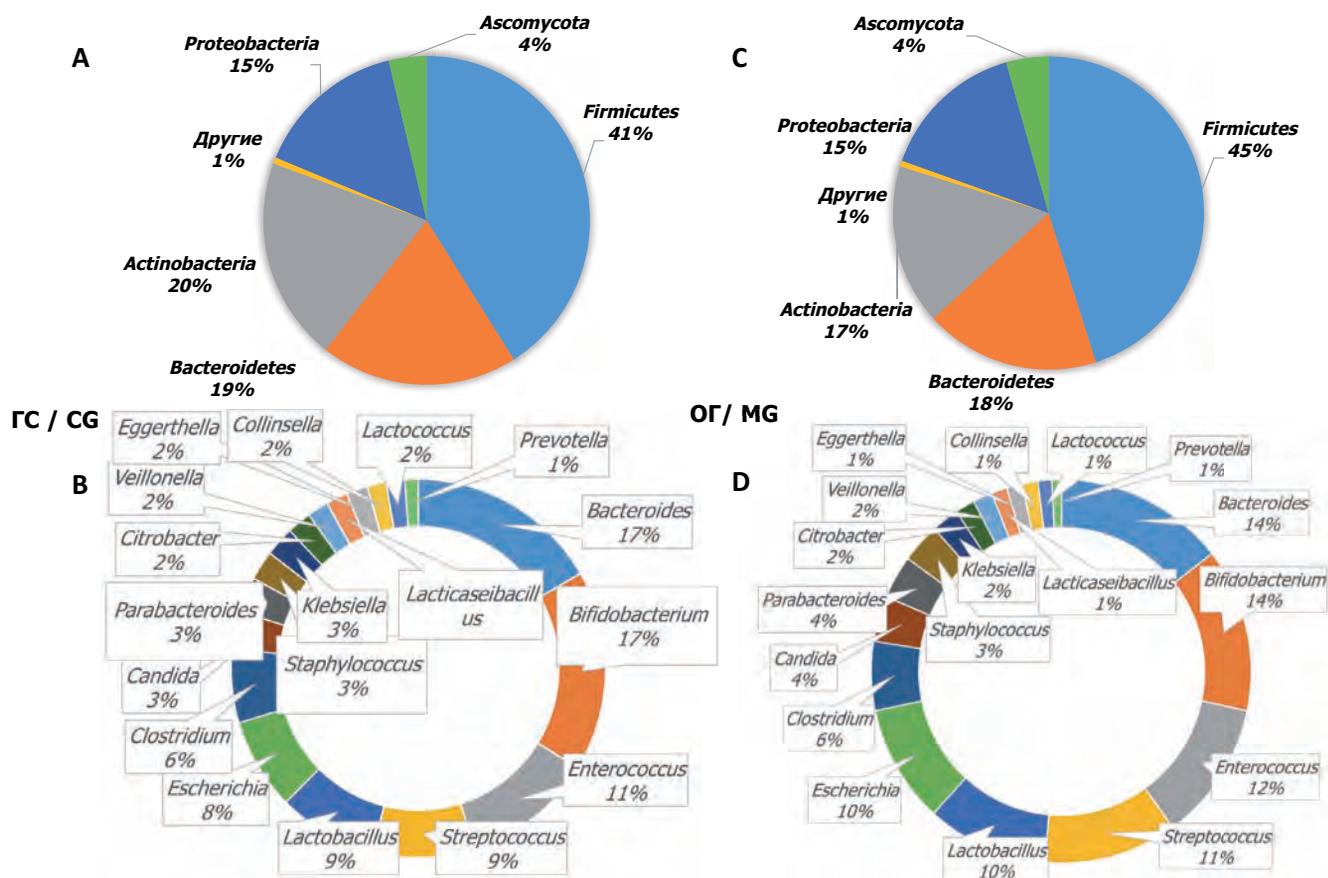


Рис. 1. Изменение состава кишечной микробиоты по типам и родам у пациенток основной группы (C, D) и группы сравнения (A, B). GC – группа сравнения, ОГ – основная группа.
 Fig. 1. Changes in the composition of the intestinal microbiota by type and gender in patients of the main group (C, D) and the comparison group (A, B). CG – comparison group, MG – main group.

Методы исследования

В ходе работы выполнено микробиологическое исследование просветной микробиоты ЖКТ методом культуромики с использованием расширенного спектра универсальных, селективных и дифференциально-диагностических питательных сред. Пробы фекалий собирали в стерильный контейнер без консерванта и доставляли в лабораторию в течение 3 ч. Для оценки видового и количественного состава (в пересчете на 1 г биоматериала) готовили десятикратные серийные разведения фекалий в физиологическом растворе с последующим посевом на питательные среды.

Для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов использовали: колумбийский кровяной агар, хромогенную среду *Brilliance*, сальмонелла-шигелла агар, декстрозный агар, среду для выявления и дифференциации *Streptococcus agalactiae* (CHROMagar; Франция), маннит-солевой агар (Himedia; Индия), энтерококковый агар, агар Эндо (ФГУН «ГНЦ ПМБ»; Россия), для грибов – агар Сабуро (Oxoid; Великобритания). Засеянные чашки Петри помещали в термостат (37°C и для грибов дополнительно – 30°C). Микроаэрофилы выращивали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при 37°C: лактобациллы – на лактобакагаре (ФГУН «ГНЦ ПМБ»; Россия), кампилобактер – на среде для выделения кампилобактера. Obligatные анаэробы культивировали на предварительно редуцированных средах: агаре Шедлера с необходимыми добавками, основ-

ном агаре для анаэробов, железосульфитном агаре, перфрингенс-агаре, селективном агаре для *Clostridium difficile* (Oxoid; Великобритания); агаре для бифидобактерий (Himedia; Индия) в условиях анаэробного бокса (Whitley DG 250 Anaerobic Workstation, Великобритания) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N₂ – 80%; CO₂ – 10%; H₂ – 10%) в течение 3–4 суток. Видовую идентификацию проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре MicroFlex, с программным обеспечением MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия), версия 5.0. Микроорганизм считали идентифицированным до вида с высокой степенью вероятности при значениях SCORE ≥ 2,0.

Статистический анализ

Размер выборки определялся сопоставимым с представленными в исследованиях других авторов [6–11]. Для статистической обработки данных использовались программы IBM SPSS Statistics (v.26) и MedCalc statistical software (версия 20.104–64-bit). Для количественных показателей были рассчитаны: среднее значение (*M*), среднеквадратическое отклонение (*SD*), медиана (*Me*), интерквартильный интервал (*Q1*; *Q3*), для качественных и порядковых показателей – частоты (%). Все количественные параметры были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Параметры, имеющие распреде-

ление, отличное от нормального, представлены в формате *Me* (Q1; Q3). Для нахождения различий между группами применяли критерий Манна–Уитни (для количественных показателей) и χ^2 (для категориальных показателей). Расчет видового богатства проводился с использованием индексов Маргалефа, Менхиника, а также индексов Симпсона, Шеннона для выявления изменения таксономического разнообразия (альфа-разнообразия). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В основной группе и группе сравнения выделены 656 и 477 штаммов микроорганизмов соответственно, принадлежавших к пяти типам микроорганизмов: *Bacillota* (ранее *Firmicutes*), *Bacteroidota* (ранее *Bacteroidetes*), *Actinomycetota* (ранее *Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (ранее *Proteobacteria*) и *Ascomycota*. Микробное разнообразие было представлено 12 классами, 20 порядками, 38 семействами, 51 родом и 163 видами микроорганизмов, что проиллюстрировано на рис. 1.

Превалирующими типами микроорганизмов в основной группе и группе сравнения были *Bacillota* (45,27 и 41,39%) и *Bacteroidota* (18,29 и 19,71% соответственно). Показано, что у пациенток с НГЭ отмечался значимо больший индекс *Bacillota/Bacteroidota* (рис. 2).

Для пациенток с НГЭ также характерно значимо меньшее как видовое, так и таксономическое разнообразие микроорганизмов при отсутствии разницы в их абсолютном количестве (титр КОЕ/г, $p > 0,05$) (рис. 3).

Статистически значимые отличия по количественным показателям и частоте выявляемости отдельных родов и видов микроорганизмов представлены в табл. 1, 2.

При детальном анализе состава КМ установлено, что среди грамотрицательной факультативно-анаэробной ми-

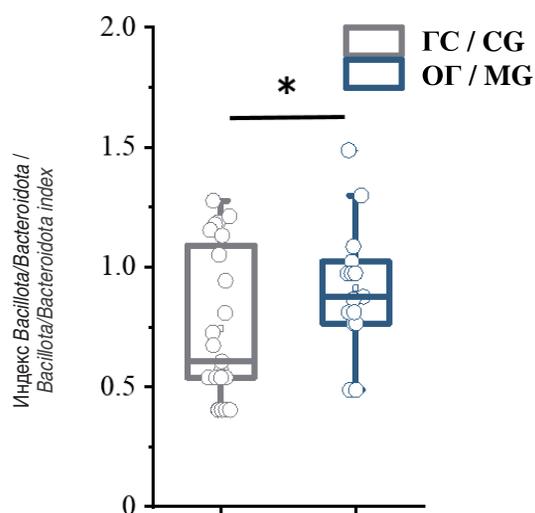


Рис. 2. Индекс *Bacillota/Bacteroidota* у пациенток основной группы и группы сравнения. ГС – группа сравнения, ОГ – основная группа; Манна–Уитни тест, * $p = 0,04806$.

Fig. 2. The *Bacillota/Bacteroidota* index in patients of the main group and the comparison group. CS – comparison group, MG – main group; Mann–Whitney test, * $p = 0.04806$.

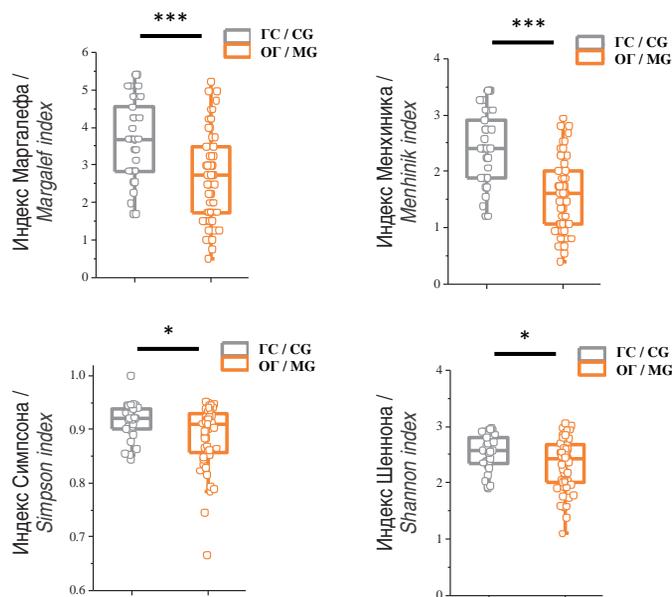


Рис. 3. Индексы видового богатства (Маргалефа, Менхиника) и альфа-разнообразия (Симпсона, Шеннона) кишечной микробиоты пациенток исследуемых групп. Манна–Уитни тест, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; ГС – группа сравнения, ОГ – основная группа.

Fig. 3. Indices of species richness (Margalef, Menhinik) and alpha diversity (Simpson, Shannon) of the intestinal microbiota of the patients of the studied groups. Mann–Whitney test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; CS – comparison group, MG – main group.

крофлоры в обеих группах доминировала *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, преимущественно в умеренных и высоких титрах – 10^7 – 10^8 КОЕ/г, частота встречаемости в основной группе составила 53/56 (94,64%), в группе сравнения – 34/35 (97,14%). У пациенток с НГЭ в 4 раза чаще по отношению к группе сравнения высевалась лактозонегативная *E. coli* (7/56 (12,5%) и 1/35 (2,86%) соответственно), отмечался единичный случай гемолитической *E. coli*. Значительно реже встречались другие условно-патогенные энтеробактерии: *Citrobacter* spp. – у 9/56 (16,07%) и 4/35 (11,43%) пациенток, *Enterobacter* spp. – у 4/56 (7,14%) и 7/35 (20,0%), *Klebsiella* spp. – у 14/56 (25,0%) и 8/35 (22,86%) пациенток соответственно. Значимая разница отмечена для *Enterobacter cloacae*, частота выявляемости которого была в 9,5 раза ниже у пациенток с НГЭ, а также *C. freundii*, титр которого был в 1,5 раза выше при эндометриозе (табл. 1, 2).

Превалирующими представителями грамположительных факультативно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) были *Streptococcus* spp., преимущественно *S. anginosus*, выявленные у каждой третьей пациентки с НГЭ, что было в 3 раза чаще, чем в группе сравнения. Бактерии *Enterococcus* spp. присутствовали в микробиоте 70% пациенток и были преимущественно представлены видами с нормальной ферментативной активностью – *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. galinarum* в умеренных титрах 10^6 – 10^7 КОЕ/г. Обращало на себя внимание, что у каждой седьмой пациентки с НГЭ выделяли *E. avium* (8/56, 14,9%), в то время как в группе сравнения он отсутствовал (табл. 2).

Стафилококки (6 видов у пациенток с НГЭ и 4 вида у женщин группы сравнения) чаще выделяли у пациенток с эндометриозом и в значимо большем титре в отличие от группы

Таблица 1. Титр микроорганизмов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом и группы сравнения
Table 1. The titre of microorganisms in patients with endometriosis and the comparison group

Микроорганизмы / Microorganisms	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г (медиана (ИКР)) / Number of microorganisms, lg CFU/g (Me (Q1; Q3))		p-value
	основная группа / main group	группа сравнения / comparison group	
<i>Bacteroides fragilis</i>	9,0 (8,0;10,0)	8,0 (8,0;8,0)	0,0289
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8,5 (7,0;10,0)	10,0 (10,0;10,0)	0,0046
<i>Bacteroides clarus</i>	9,5	8,0 (8,0;8,0)	0,0157
<i>Collinsella aerofaciens</i>	8,0 (8,0;10,0)	10,0 (10,0;10,0)	0,0321
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	9,5 (8,5;10,0)	8,0 (7,25;9,0)	0,0437
<i>Clostridium</i> spp.	7,0 (6,0;8,0)	6,0 (6,0;6,0)	0,0240
<i>Clostridium innocuum</i>	8,0 (7,0;8,0)	6,0 (6,0;7,0)	0,0035
<i>Citrobacter freundii</i>	6,0 (6,0;6,75)	4,0	0,0429
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,0 (5,0;6,0)	4,0 (4,0;4,5)	0,0097
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,0 (4,5;5,5)	4,0 (4,0;4,0)	0,0281
<i>Enterococcus</i> spp.	6,0 (6,0;7,0)	6,0 (6,0;8,0)	0,0371

Таблица 2. Частота встречаемости микроорганизмов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом и группы сравнения
Table 2. Incidence of microorganisms in patients with endometriosis and the comparison group

Микроорганизмы / Microorganisms	Частота встречаемости микроорганизмов (в % и абсолютное значение) / Occurrence frequency of microorganisms (in % and absolute value)		p-value
	основная группа / main group	группа сравнения / comparison group	
<i>Bacteroides ovatus</i>	16,07% (9/56)	37,14% (13/35)	0,023
<i>Parabacteroides merdae</i>	5,36% (3/56)	20,0% (7/35)	0,030
<i>Collinsella aerofaciens</i>	14,29% (8/56)	31,43% (11/35)	0,049
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1,79% (1/56)	14,29% (5/35)	0,02
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	14,29% (8/56)	40,0% (14/35)	0,006
<i>Weissella</i> spp.	3,57% (2/56)	17,14% (6/35)	0,027
<i>Weissella viridescens</i>	0	8,57% (3/35)	0,026
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,79% (1/56)	17,14% (6/35)	0,008
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	10,71% (6/56)	0	0,046
<i>Enterococcus avium</i>	14,29% (8/56)	0	0,020
<i>Streptococcus anginosus</i>	32,14% (18/56)	11,43% (4/35)	0,025

сравнения (6,0 (5,0; 6,0) КОЕ/г и 4,0 (4,0; 4,5) КОЕ/г соответственно). Обращает на себя внимание более высокий уровень колонизации ЖКТ (5,0 (4,5; 5,5) КОЕ/г) *S. aureus* у пациенток с НГЭ (табл. 1).

Облигатно-анаэробная часть КМ преимущественно представлена семейством *Bacteroidaceae*. В группе сравнения в 2 раза чаще встречались *B. ovatus*, а также отмечен более высокий уровень колонизации *B. vulgatus*. При этом для па-

циенток с НГЭ были характерны более высокие титры *B. clarus* и *B. fragilis*. Среди *Parabacteroides* spp. интерес представляет вид *P. merdae*, встречающийся в 4 раза чаще в группе сравнения (табл. 1, 2). Также отмечалось уменьшение частоты обнаружения *Prevotella copri* (порядок *Bacteroidales*) у пациенток с НГЭ в отличие от группы сравнения (5/56 (8,93%) и 5/35 (14,3%) соответственно), однако результаты не достигли статистической значимости.

Clostridium spp. выделяли практически у каждой второй пациентки с НГЭ (25/56, 44,64%) и в значимо больших титрах в сравнении с условно здоровыми женщинами (7,0 (6,0; 8,0) КОЕ/г и 6,0 (6,0; 6,0) КОЕ/г соответственно). Наиболее высокие количественные показатели отмечены для вида *C. innocuum*.

Среди прочих облигатно-анаэробных УПМ внимания заслуживает *C. aerofaciens* (семейство *Coriobacteriaceae*), которую в 2 раза чаще, в отличие от пациенток с НГЭ, выявляли в группе сравнения (11/35 (31,43%) и 8/56 (14,29%) соответственно) в высоком титре – 10^{10} КОЕ/г.

Значительную часть КМ составили микроорганизмы из группы симбионтов – *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp.

Лактобациллы выделяли в группе сравнения практически в 2 раза чаще, чем в основной группе (7/35 (20%) и 7/56 (12,5%) соответственно), преимущественно *L. paracasei* (10/56 (17,86%), *L. rhamnosus* (8/56 (14,29%), *L. gasseri* (7/56 (12,5%), *L. salivarius* (7/56 (12,5%) и *L. crispatus* (5/56 (8,93%) в умеренных (10^4 – 10^7 КОЕ/г) и высоких (10^8 – 10^{11} КОЕ/г) титрах. В группе сравнения в 5 раз чаще высевали *Weissella* spp. (молочнокислые бактерии, также представляющие семейство *Lactobacillaceae*) – 6/35 (17,14%) и 2/56 (3,57%) соответственно.

Бифидобактерии встречались значительно чаще, чем лактобациллы, и обнаружены у 52/56 (92,86%) пациенток с НГЭ и 35/35 (100%) женщин группы сравнения, преимущественно в умеренных и высоких титрах – 10^7 – 10^{10} КОЕ/г. У пациенток с НГЭ превалировали три вида: *B. longum* (39/56 (69,64%), *B. adolescentis* (14/56 (25,0%) и *B. bifidum* (12/56 (21,43%). При этом у пациенток с НГЭ, в отличие от группы сравнения, в 3 раза реже высевали *B. pseudocatenulatum* (14,29 и 40,0%) и в 8 раз – *B. catenulatum* (1,79 и 14,29% соответственно) (табл. 2).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали дисбаланс состава КМ у пациенток с НГЭ, что проявлялось снижением таксономического и видового разнообразия, увеличением индекса *Bacillota/Bacteroidota*, снижением комменсальных бактерий *Collinsella* spp. и *Bifidobacterium* spp. и увеличением УПМ типа *Pseudomonadota* (рис. 4).

В ходе проведенного исследования были установлены изменения соотношения ряда микробных сообществ, что согласуется с рядом ранее проведенных исследований. Так, в работе A.Swensson et al. продемонстрировано снижение альфа- и бета-разнообразия КМ у пациенток с эндометриозом [7]. Однако наибольший интерес представляет соотношение *Bacillota/Bacteroidota*, которое является значимым показателем при оценке микробного состава и тесно связано с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Увеличение данного индекса может быть связано с повышением количества УПМ типа *Bacillota*, которые способны продуцировать ряд внеклеточных протеаз и других метаболитов

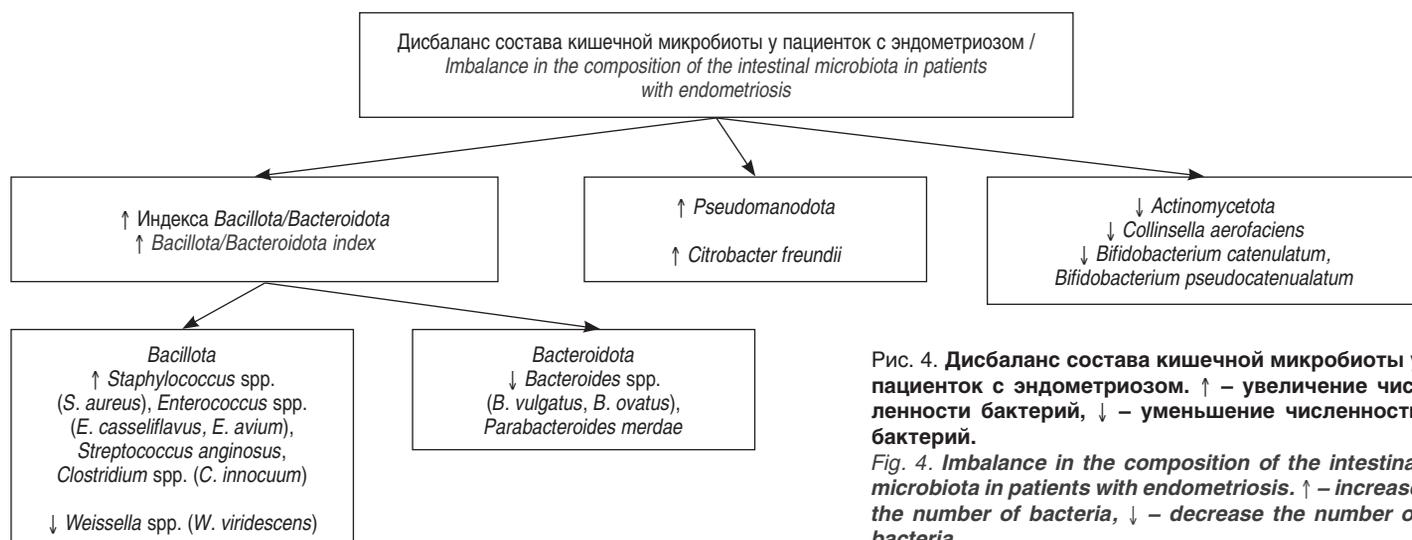


Рис. 4. Дисбаланс состава кишечной микробиоты у пациенток с эндометриозом. ↑ – увеличение численности бактерий, ↓ – уменьшение численности бактерий.

Fig. 4. Imbalance in the composition of the intestinal microbiota in patients with endometriosis. ↑ – increase the number of bacteria, ↓ – decrease the number of bacteria.

(гистамин, триптазы и др.), провоцирующих аномальные нейрореакции и впоследствии приводящих к развитию СРК [16]. Учитывая, что наличие СРК увеличивает шансы на последующую верификацию эндометриоза более чем в 3 раза, такие изменения состава КМ являются значимыми [17]. Кроме того, отмечалось снижение частоты выявления комменсальных бактерий *Weissella* spp. (тип *Bacillota*). По данным литературы, ряд микроорганизмов рода *Weissella* обладают пробиотическим потенциалом за счет продукции декстрана, что способствует улучшению метаболизма и функции ЖКТ, а также стимулирует рост других комменсальных микроорганизмов, главным образом *Bifidobacterium* spp. [18]. Кроме того, бактерии *Weissella* spp. способны колонизировать стенку кишечника, создавая муциновую защитную пленку, и обладают антимикробным потенциалом в отношении *S. aureus* и других УПМ [19]. Таким образом, уменьшение числа бактерий рода *Weissella* у пациенток с НГЭ может приводить к снижению защитных функций кишечного барьера и потенциально способствовать формированию других изменений состава КМ в виде увеличения популяции УПМ и снижения бактерий-комменсалов типа *Actinomycetota*.

На увеличение индекса *Bacillota/Bacteroidota* у пациенток с НГЭ также влияло снижение количества симбионтных бактерий типа *Bacteroidota* – *Bacteroides* spp. и *Parabacteroides* spp. В нашем исследовании у пациенток с НГЭ наблюдалось снижение частоты выделения бактерий порядка *Bacteroidales*: *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *P. merdae*; снижение численности *B. vulgatus*. В то же время отмечен более высокий уровень колонизации ЖКТ *B. clarus* и *B. fragilis*.

Бактероиды являются важной составляющей микробиоты кишечника человека, выступая в роли бактерий-комменсалов. Так, вид *B. ovatus* обладает пробиотическим потенциалом, участвует в синтезе активных метаболитов – «полезных» короткоцепочечных жирных кислот – ацетата, пропионата и бутирата, имеющих противовоспалительный и иммуномодулирующий потенциал, а также поддерживающих целостность кишечного барьера [20, 21]. *B. vulgatus* также является значимой частью кишечного гомеостаза, участвует в метаболизме гликанов кишечной слизи как напрямую, так и опосредованно за счет увеличения колонизации труднокультивируемого комменсала *Akkermansia muciniphila* [22].

По данным литературы, *B. clarus* и энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis* показали себя как бактерии-кандидаты раннего скрининга колоректального рака [23]. Кроме того, известно, что ряд представителей семейства *Bacteroidaceae*, в т.ч. выявленных в нашем исследовании, являются частью эстроболома, ввиду чего можно предполагать их вклад в формирование эндогенной гиперэстрогении, способствующей развитию и прогрессированию НГЭ [24]. Таким образом, можно полагать, что у пациенток с НГЭ значимо не только снижение числа отдельных бактериоидов, что способствует дисбалансу кишечного гомеостаза, но также их соотношение и влияние на рост других комменсальных микроорганизмов, что требует подтверждения в будущих исследованиях.

По результатам проведенного исследования при НГЭ выявлено значимое увеличение частоты встречаемости и титра бактерий рода *Citrobacter* (тип *Pseudomonadota*) и, в частности, *C. freundii* – УПМ, который может присутствовать в составе нормофлоры ЖКТ, но в низких концентрациях. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными факультативно-анаэробными микроорганизмами, имеющими в составе клеточной стенки ЛПС, что может играть роль в развитии воспалительного иммунного ответа [25]. Несмотря на относительно низкую вирулентность, *Citrobacter* spp. и *C. freundii* в частности могут способствовать развитию гнойно-септических осложнений, доля которых в структуре грамотрицательных инфекций составляет до 0,8% [26]. Кроме того, в работе Q.Lin et al, где проводилась оценка микробиоты эндометрия, *C. freundii* была определена как одна из бактерий-кандидатов, ассоциированных с аденомиозом [27].

Изучение состава КМ представляет интерес с точки зрения поиска новых методов терапии эндометриоза. В экспериментальных исследованиях отмечена некоторая польза приема пробиотиков на основе штаммов *L. gasseri* для подавления роста эндометриоидных гетеротопий. Предполагаемый патогенетический механизм заключается в иммуностимулирующей активности посредством активации естественных киллеров [28, 29]. S.B.Chadchan et al. показали, что при введении мышам с эндометриозом антибиотиков широкого спектра действия отмечалось уменьшение размеров эндометриоидных очагов примерно в 5 раз со значимым

снижением концентрации провоспалительных факторов в перитонеальной жидкости. При этом пероральная трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) от мышей-реципиентов с эндометриозом способствовала возобновлению роста эктопических очагов у мышей, получавших метронидазол [30]. Результаты являются многообещающими, поскольку ТФМ в перспективе может позволить закрыть нишу консервативной терапии у пациенток, рефрактерных к «классическим» медикаментозным схемам, или в сложных случаях – при многократных рецидивах заболевания или распространенном НГЭ.

Заключение

Таким образом, у пациенток с НГЭ наблюдался дисбаланс состава КМ, который проявлялся снижением таксономического и видового разнообразия, а также изменением соотношения ряда микробных сообществ.

Установлено увеличение индекса *Bacillota/Bacteroidota* за счет увеличения доли факультативно-анаэробных (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp.) и облигатно-анаэробных (*Clostridium* spp.) УПМ (тип *Bacillota*) и снижения доли микроорганизмов типа *Bacteroidota* (*Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp.) на фоне уменьшения популяции комменсальных микроорганизмов (*Weissella* spp., *Collinsella* spp. и *Bifidobacterium* spp.), что может способствовать снижению защитных функций кишечного барьера и снижению колонизации ЖКТ другими комменсальными микроорганизмами.

Кроме того, отмечалось повышение частоты встречаемости и генерации грамотрицательных УПМ типа *Pseudomonadota* – *Citrobacter* spp., обладающих провоспалительным потенциалом за счет ЛПС бактериальной стенки.

Полученные сведения о возможном участии КМ в патогенезе НГЭ свидетельствуют о необходимости продолжения поиска значимых маркерных микроорганизмов НГЭ и его отдельных форм, что в перспективе может позволить усовершенствовать неинвазивную диагностику и терапию заболевания.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Funding information

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

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

Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациента.

Informed consent

In carrying out the study, written informed consent was obtained from the patient.

Литература / References

- Moradi Y, Shams-Beyranvand M, Khateri S, Gharahjeh S, Tehrani S, Varse F, et al. A systematic review on the prevalence of endometriosis in women. *Indian J Med Res.* 2021 Mar;154(3):446-454. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_817_18
- Agarwal SK, Antunez-Flores O, Foster WG, Hermes A, Golshan S, Soliman AM, et al. Real-world characteristics of women with endometriosis-related pain entering a multidisciplinary endometriosis program. *BMC Womens Health.* 2021 Jan 7;21(1):19. DOI: 10.1186/s12905-020-01139-7
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, et al. *Escherichia coli* contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2860-3.e1-3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.053
- Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe.* 2011 Oct 20;10(4):324-35. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.003
- Kwa M, Plottel CS, Blaser MJ, Adams S. The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor-Positive Female Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Apr 22;108(8):djw029. DOI: 10.1093/jnci/djw029
- Ata B, Yildiz S, Turkgeldi E, Brocal VP, Dinleyici EC, Moya A, et al. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. *Sci Rep.* 2019 Feb 18;9(1):2204. DOI: 10.1038/s41598-019-39700-6
- Svensson A, Brunkwall L, Roth B, Orho-Melander M, Ohlsson B. Associations Between Endometriosis and Gut Microbiota. *Reprod Sci.* 2021 Aug;28(8):2367-2377. DOI: 10.1007/s43032-021-00506-5
- Shan J, Ni Z, Cheng W, Zhou L, Zhai D, Sun S, et al. Gut microbiota imbalance and its correlations with hormone and inflammatory factors in patients with stage 3/4 endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2021 Nov;304(5):1363-1373. DOI: 10.1007/s00404-021-06057-z
- Perrotta AR, Borrelli GM, Martins CO, Kallas EG, Sanabani SS, Griffith LG, et al. The Vaginal Microbiome as a Tool to Predict rASRM Stage of Disease in Endometriosis: a Pilot Study. *Reprod Sci.* 2020 Apr;27(4):1064-1073. DOI: 10.1007/s43032-019-00113-5
- Chang CY, Chiang AJ, Lai MT, Yan MJ, Tseng CC, Lo LC, et al. A More Diverse Cervical Microbiome Associates with Better Clinical Outcomes in Patients with Endometriosis: A Pilot Study. *Biomedicines.* 2022 Jan 14;10(1):174. DOI: 10.3390/biomedicines10010174
- Leonardi M, Hicks C, El-Assaad F, El-Omar E, Condous G. Endometriosis and the microbiome: a systematic review. *BJOG.* 2020 Jan;127(2):239-249. DOI: 10.1111/1471-0528.15916
- Кириллова ЕД, Муравьева ВВ, Исаева ЕЛ, Skorobogatyy AV, Zhigalova KN, Kozlova AA, et al. Особенности микробиоты кишечника у пациенток с синдромом поликистозных яичников. *Вестник РАМН.* 2023;78(4):269-280. / Kirillova ED, Muravieva VV, Isaeva EL, Skorobogatyy AV, Zhigalova KN, Kozlova AA, et al. Features of the gut microbiota in patients with polycystic ovary syndrome. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2023;78(4):269-280. DOI: 10.15690/vramn6442 (In Russian).
- Кебурия ЛК, Смольникова ВЮ, Припутневич ТВ, Муравьева ВВ, Трофимов ДЮ, Шубина ЕС, и др. Микробиота полости матки и неудачи имплантации. Есть ли связь? Акушерство и гинекология. 2021;7:133-43. / Keburiya LK, Smol'nikova VYu, Priputnevich TV, Murav'eva VV, Trofimov DYu, Shubina ES, et al. Uterine microbiota and implantation failure: is there a link? *Obstetrics and Gynecology.* 2021;7:133-43. DOI: 10.18565/aig.2021.7.133-143 (In Russian).
- Huang L, Liu B, Liu Z, Feng W, Liu M, Wang Y, et al. Gut Microbiota Exceeds Cervical Microbiota for Early Diagnosis of Endometriosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Dec 7;11:788836. DOI: 10.3389/fcimb.2021.788836
- Maroun P, Cooper MJ, Reid GD, Keirse MJ. Relevance of gastrointestinal symptoms in endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009 Aug;49(4):411-4. DOI: 10.1111/j.1479-828X.2009.01030.x

16. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1792-801. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.043
17. Chiapparino F, Cipriani S, Ricci E, Mauri PA, Esposito G, Barretta M, et al. Endometriosis and irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2021 Jan;303(1):17-25. DOI: 10.1007/s00404-020-05797-8
18. Fusco V, Quero GM, Cho GS, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W, Franz CM. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol*. 2015 Mar 17;6:155. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00155
19. Ahmed S, Singh S, Singh V, Roberts KD, Zaidi A, Rodriguez-Palacios A. The *Weissella* Genus: Clinically Treatable Bacteria with Antimicrobial/Probiotic Effects on Inflammation and Cancer. *Microorganisms*. 2022 Dec 7;10(12):2427. DOI: 10.3390/microorganisms10122427
20. Horvath TD, Ihekweazu FD, Haidacher SJ, Ruan W, Engevik KA, Fultz R, et al. *Bacteroides ovatus* colonization influences the abundance of intestinal short chain fatty acids and neurotransmitters. *iScience*. 2022 Mar 25;25(5):104158. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104158
21. Singh V, Lee G, Son H, Koh H, Kim ES, Unno T, et al. Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Front Microbiol*. 2023 Jan 12;13:1103836. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1103836
22. You HJ, Si J, Kim J, Yoon S, Cha KH, Yoon HS, et al. *Bacteroides vulgatus* SNUG 40005 Restores Akkermansia Depletion by Metabolite Modulation. *Gastroenterology*. 2023 Jan;164(1):103-116. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.09.040
23. Zhou P, Yang D, Sun D, Zhou Y. Gut microbiome: New biomarkers in early screening of colorectal cancer. *J Clin Lab Anal*. 2022 May;36(5):e24359. DOI: 10.1002/jcla.24359
24. Pollet RM, D'Agostino EH, Walton WG, Xu Y, Little MS, Biernat KA, et al. An Atlas of β -Glucuronidases in the Human Intestinal Microbiome. *Structure*. 2017 Jul 5;25(7):967-977.e5. DOI: 10.1016/j.str.2017.05.003
25. Anderson MT, Mitchell LA, Zhao L, Mobley HLT. *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. *Sci Rep*. 2018 Aug 7;8(1):11792. DOI: 10.1038/s41598-018-30196-0
26. Lee R, Choi SM, Jo SJ, Lee J, Cho SY, Kim SH, et al. Clinical Characteristics and Antimicrobial Susceptibility Trends in *Citrobacter* Bacteremia: An 11-Year Single-Center Experience. *Infect Chemother*. 2019 Mar;51(1):1-9. DOI: 10.3947/ic.2019.51.1.1
27. Lin Q, Duan H, Wang S, Guo Z, Wang S, Chang Y, et al. Endometrial microbiota in women with and without adenomyosis: A pilot study. *Front Microbiol*. 2023 Jan 20;14:1075900. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1075900
28. Itoh H, Sashihara T, Hosono A, Kaminogawa S, Uchida M. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 inhibits development of ectopic endometrial cell in peritoneal cavity via activation of NK cells in a murine endometriosis model. *Cytotechnology*. 2011 Mar;63(2):205-10. DOI: 10.1007/s10616-011-9343-z
29. Uchida M, Kobayashi O. Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the induced endometriosis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(9):1879-81. DOI: 10.1271/bbb.130319
30. Chadchan SB, Cheng M, Parnell LA, Yin Y, Schriefer A, Mysorekar IU, et al. Antibiotic therapy with metronidazole reduces endometriosis disease progression in mice: a potential role for gut microbiota. *Hum Reprod*. 2019 Jun 4;34(6):1106-1116. DOI: 10.1093/humrep/dez041

Информация о соавторах:

Гордеев Алексей Борисович, кандидат биологических наук, заведующий отделом молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Муравьева Вера Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Скоробогатый Алексей Викторович, младший научный сотрудник отделения клинической фармакологии антимикробных и иммунобиологических препаратов Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Жигалова Ксения Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Денисов Павел Александрович, научный сотрудник лаборатории биоинформационного анализа Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Чернуха Галина Евгеньевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения гинекологической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Припутневич Татьяна Валерьевна, чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России; профессор кафедры микробиологии и вирусологии Педиатрического факультета ФGAOY BO «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России

Information about co-authors:

Alexey B. Gordeev, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Vera V. Muravieva, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Alexey V. Skorobogatiy, Junior Researcher of the Clinical Pharmacology of Antimicrobial and Immunobiological drugs Unit, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Ksenia N. Zhigalova, Junior Researcher of the Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Pavel A. Denisov, Researcher of the Laboratory of bioinformatics, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Galina E. Chernukha, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Researcher, Department of gynecological endocrinology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Tatiana V. Pripitnevich, MD, PhD, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology and Virology, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Модель пневмококковой пневмонии у мышей

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

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

Разработана и описана модель пневмококковой пневмонии у мышей линии BALB/c, вызываемая штаммом *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305. Интраназальное введение культуры в дозе 40 ЛД₅₀ приводит к быстрому развитию пневмонии с генерализацией пневмококковой инфекции, в результате чего все животные погибают в течение 4 суток. В крови мышей наблюдается снижение количества лейкоцитов при повышении доли гранулоцитов и уменьшении доли лимфоцитов. Отмечается изменение некоторых биохимических показателей в сыворотке крови. В легочной ткани развиваются патологические изменения воспалительного характера, а в печени – некрозы. Органы иммунной системы реагируют на инфекцию уменьшением объема лимфоидной ткани. Разработанная нами модель пневмококковой пневмонии у мышей является пригодной для оценки активности антибактериальных препаратов. Левофлоксацин в суточных дозах 25 и 100 мг/кг дает хороший лечебный эффект. Однако выживаемость мышей, инфицированных *S. pneumoniae* ATCC 6305, зависит от дозы антибиотика и составляет 70–100%. Лечение инфекции ампициллином в дозах 100 и 400 мг/кг приводит к 100%-й защите мышей от гибели.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмония, мышиная модель, антибиотикотерапия

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. Модель пневмококковой пневмонии у мышей. Бактериология. 2024; 9(3): 28–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-28-36

Model of pneumococcal pneumonia in mice

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

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

A model of pneumococcal pneumonia in BALB/c mice, caused by the *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 strain, was developed and described. Intranasal administration of the culture at a dose of 40 LD₅₀ leads to the rapid development of pneumonia with generalization of pneumococcal infection, as a result, of which all animals die within eight days. In the blood of mice, a decrease in the number of leukocytes is observed with an increase in the proportion of granulocytes and a decrease in the proportion of lymphocytes. There is a change in some biochemical parameters in the blood serum. Pathological changes of an inflammatory nature develop in the lung tissue, and necrosis in the liver. Organs of the immune system react to infection by reducing the volume of lymphoid tissue. The model of pneumococcal pneumonia developed by us in mice is suitable for assessing the activity of antibacterial drugs. Levofloxacin in daily doses of 25 and 100 mg/kg gives a good therapeutic effect. However, the survival rate of mice infected with *S. pneumoniae* ATCC 6305 depends on the antibiotic dose and ranges from 70 to 100%. Treatment of infection with ampicillin at doses of 100 mg/kg and 400 mg/kg resulted in 100% protection of mice from death.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumonia, mouse model, antibiotic therapy

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A. Model of pneumococcal pneumonia in mice. Bacteriology. 2024; 9(3): 28–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-28-36

Streptococcus pneumoniae – условно-патогенная грамотрицательная бактерия, способная вызывать легочную инфекцию у людей. Особый риск *S. pneumoniae* представляют для здоровья детей в возрасте до 5 лет [1]. У 20–40% здоровых детей в составе микрофлоры носоглотки имеются пневмококки, но с возрастом количество носителей этих микроорганизмов снижается до 5–10% [2]. Среди возбудите-

лей острых респираторных инфекций доля бактерии *S. pneumoniae* достигает 13,8%, а детская смертность, по некоторым данным, составляет 11% [3]. При благоприятных условиях пневмококки способны из носоглотки проникать в соседние органы и распространяться с кровотоком по организму человека, вызывая тяжелые заболевания – средний отит, пневмонию, менингит, сепсис [4, 5].

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-01-47
E-mail: borzilov@obolensk.org

Статья поступила 07.02.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Alexander I. Borzilov, PhD, MD, Researcher of biological testing laboratory 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) 36-01-47
E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 07.02.2024, accepted for publication 30.09.2024

На протяжении многих лет исследователи во всем мире ведут разработку актуальных поливалентных вакцин и антибактериальных препаратов, направленных против *S. pneumoniae* [6, 7]. Для оценки их эффективности *in vivo* используют различные модели пневмококковой инфекции – сепсис, отит, менингит, пневмония [8–11].

Экспериментальную легочную пневмококковую инфекцию воспроизводят двумя методами введения: интратрахеальным [12] и интраназальным [13, 14]. Первый способ инфицирования позволяет доставить в легкие максимальное количество заражающих бактерий, но при этом сама манипуляция более сложная и рискованная с технической точки зрения. В качестве модельных животных для воспроизведения пневмококковой пневмонии с успехом используют как инбредных [11, 15], так и аутбредных мышей [16, 17]. Показано, что у разных линий мышей пневмококковая пневмония может протекать остро или подостро. Так, например, гибель мышей линии BALB/c наступает в течение 2–4 дней после заражения, а мыши C57BL погибают на 8–10-е сутки [15].

Интраназальный способ – наиболее простой, атравматичный и наиболее применяемый на практике. Некоторые исследователи выбирают для инфицирования мышей низкие заражающие дозы пневмококка, стараясь максимально моделировать инфекцию у человека [14]. Так, например, К.Л.Крышень с соавт. для моделирования пневмонии заражали мышей линии BALB/c интраназально культурой *S. pneumoniae* ATCC 6303 (серогруппа тип 3) в дозе $5 \cdot 10^5$ КОЕ для исследования патологических изменений в легких [18]. Однако для оценки эффективности антибактериальных препаратов чаще используют высокие дозы патогена, которые вызывают у мышей воспалительный процесс в легких с последующим развитием сепсиса [6, 13]. Достаточно часто при воспроизведении летальной пневмонии берут мышей с индуцированным иммунодефицитом, что позволяет снизить заражающую дозу до 10^4 – 10^5 КОЕ [14, 19]. Интраназальную модель пневмококковой пневмонии часто используют для изучения активности антибактериальных препаратов [14, 15, 20] и эффективности вакцин [21, 22]. После интраназального или интратрахеального заражения модельных животных исследуют обсемененность пневмококками легких и других органов, патологические изменения в них, иммунологический статус, показатели гомеостаза, регистрируют выживаемость и средние сроки гибели животных и т.д.

В ходе наших исследований мы разработали и описали модель легочной пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c, вызываемой штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, который относится к серогруппе 5. Модель является летальной, но поддается лечению антибиотиками. Разработанная модель пневмококковой пневмонии пригодна для оценки эффективности *in vivo* антибактериальных препаратов.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Для моделирования пневмококкового сепсиса использовали штамм *S. pneumoniae* ATCC 6305 (инв. № В-7398) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Штамм относится к серогруппе 5 и обладает вирулентностью в отношении имму-

нокомпетентных мышей BALB/c при интраназальном введении. Штамм чувствителен к эритромицину, кларитромицину, азитромицину, линкомицину, клиндомицину, тетрациклину, левофлоксацину, спарфлоксацину, моксифлоксацину, га-тифлоксацину, ванкомицину, рифампицину, хлорамфениколу и линезолиду. Минимальные подавляющие концентрации цефотаксима составляют 0,008 мкг/мл, ампициллина – <0,008 мкг/мл, меропенема – <0,004 мкг/мл, кларитромицина – <0,004 мкг/мл, левофлоксацина – 0,5 мкг/мл, ванкомицина – 0,063 мкг/мл, хлорамфеникола – 2–4 мкг/мл.

Питательные среды, антибиотики

Для выращивания культуры пневмококка использовали шоколадный агар с ростовой добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Гомогенаты внутренних органов мышей и кровь высеивали на шоколадный агар с селективной и ростовой добавками (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Левофлоксацин (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и ампициллина натриевую соль (PanReas AppliChem, Германия) использовали для лечения экспериментальной пневмококковой инфекции у мышей.

Лабораторные животные

Эксперименты *in vivo* проводили на мышах линии BALB/c (самцы/самки, 17–19 г). Животных содержали в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США) в помещениях со стандартными условиями микроклимата. Мыши имели постоянный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм»). Мышей содержали группами не более 6 животных в каждой клетке. За животными проводили ежедневное ветеринарное наблюдение. Павших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

Заражение лабораторных животных

Бактериальную взвесь для интраназального инфицирования животных готовили из суточной агаровой культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305 с концентрацией $\sim 1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Культуру вводили мышам интраназально в объеме 0,02 мл ($2 \cdot 10^7$ КОЕ). Животных перед заражением обездвигивали подкожным введением 0,2%-го рометара.

Изучение динамики развития пневмококковой пневмонии

Пневмококковую пневмонию у мышей линии BALB/c воспроизводили путем интраназального введения культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀ ($2 \cdot 10^7$ КОЕ). Динамику развития летальной пневмококковой инфекции у мышей оценивали по степени обсемененности клетками пневмококка селезенки, легких, головного мозга, почек и крови животных через 3, 6, 12, 24 и 48 ч после заражения. В каждой контрольной точке по 5 мышей эвтаназировали методом декапитации. Гомогенаты органов и кровь направляли на бактериологический анализ.

Для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития пневмококковой инфекции через 48 ч после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови мышей. В это же время проводили гистологическое исследование органов мышей (легких, печени, селезенки, головного мозга, регионарных лимфатических узлов и тимуса).

Клинический анализ крови

Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе PCE-90Vet (High Technology, США) в соответствии с руководством по использованию при-

бора. Для сбора крови применяли микропробирки с К2-ЭДТА. Исследовали индивидуальные образцы крови от пяти животных в группе.

Биохимический анализ крови

Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатамино-трансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего белка, глюкозы и креатинина в сыворотках крови мышей определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax-3300 (Awareness Technology, США) с использованием реактивов UTS (ООО «Юнимед», Россия).

Бактериологический анализ органов

Легкие, селезенку, почки, и головной мозг мышей растирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенаты добавляли 1 мл стерильного физиологического раствора и перемешивали до получения однородной суспензии. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения) высевали на поверхность питательного агара. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 18–24 ч.

Гистологическое исследование органов и тканей

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

Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор пара-

форма заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа Nikon Elipse 80i и программы анализа изображения NIS Elements F4.60.00. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

Антибиотикотерапия летального пневмококкового сепсиса

Пригодность разработанной модели пневмококковой инфекции оценивали в экспериментах по антибиотикотерапии. В качестве лечебных препаратов использовали левофлоксацин и ампициллин.

После интраназального инфицирования мыши BALB/c были случайным образом распределены на лечебные и контрольных группы по 10 особей в каждой (табл. 1). Мыши из 1-й и 3-й экспериментальных групп получали подкожно по 100 мг/кг левофлоксацина 1 раз в день. 2-я и 4-я лечебные группы получали этот же препарат ежедневно по 25 мг/кг. Экстренное лечение начинали через 3 ч после заражения (группы 1 и 2), позднее лечение – через 24 ч (группы 3 и 4). Группа 5 являлась контрольной и не получала антибактериального препарата.

Мышам из групп 6 и 8 назначали ампициллин дважды в день подкожно по 200 мг/кг, а мышам из групп 7 и 9 – по 50 мг/кг. Как и в случае с левофлоксацином, терапию начинали через 3 ч (группы 6 и 7) или через 24 ч (группы 8 и 9) после инфицирования.

Таблица 1. Схема лечения летальной легочной инфекции у мышей линии BALB/c, вызванной интраназальным заражением *S. pneumoniae* ATCC 6305

Table 1. Treatment regimen for lethal pulmonary infection in BALB/c mice caused by intranasal infection with *S. pneumoniae* ATCC 6305

№ группы / Group No	Кол-во мышей в группе / Number of mice in the group	Препарат / Drug	Разовая доза препарата, мг/кг / Single dose of drug, mg/kg	Режим лечения / Treatment regimen
1	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	100	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
2	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	25	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
3	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	100	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
4	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	25	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
5	10	Без лечения / Without treatment		
6	10	Ампициллин / Ampicillin	200	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
7	10	Ампициллин / Ampicillin	50	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
8	10	Ампициллин / Ampicillin	200	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
9	10	Ампициллин / Ampicillin	50	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
10	10	Без лечения / Without treatment		

Таблица 2. Обсемененность органов и тканей мышей BALB/c бактериями *S. pneumoniae* ATCC 6305 в различные сроки пневмококковой инфекции, обусловленной интраназальным заражением в дозе 40 ЛД₅₀
Table 2. Contamination of organs and tissues of BALB/c mice with *S. pneumoniae* ATCC 6305 bacteria at different times of pneumococcal infection caused by intranasal infection at a dose of 40 LD₅₀

Время после заражения, ч / Time after infection, h	LOG ₁₀ КОЕ/г (мл) клеток <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305* / LOG ₁₀ COE/g (ml) of <i>S. pneumoniae</i> cells ATCC 6305*				
	Селезенка / Spleen	Легкое / Lung	Головной мозг / Brain	Почки / Kidneys	Кровь / Blood
3	<1	7,13 ± 0,63 (5/5)	3,56 ± 0,62 (5/5)	2,91 ± 0,11 (3/5)	<1,1
6	<1	6,49 ± 0,87 (5/5)	3,74 ± 0,68 (5/5)	2,87 ± 0,69 (5/5)	<1,1
12	<1	4,94 ± 0,44 (5/5)	4,60 ± 0,36 (5/5)	2,50 ± 0,31 (3/5)	2,66 ± 0,90 (4/5)
24	6,84 ± 0,26 (5/5)	6,54 ± 0,42 (5/5)	4,84 ± 0,27 (5/5)	5,77 ± 0,12 (5/5)	6,70 ± 0,24 (5/5)
48	7,87 ± 1,34 (5/5)	6,64 ± 0,62 (5/5)	5,49 ± 0,46 (5/5)	7,03 ± 1,01 (5/5)	7,08 ± 0,58 (5/5)

Среднее значение и стандартное отклонение (n = 5); в дробях указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *S. pneumoniae* ATCC 6305, к общему количеству животных в группе. / Mean and standard deviation (n = 5); fractions indicate the ratio of the number of animals in which *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture was detected to the total number of animals in the group.

Продолжительность антибиотикотерапии составила 5 дней. Срок наблюдения за мышами – 14 суток. Эффективность антибиотикотерапии оценивали по выживаемости и степени санации организма выживших животных от культуры тест-штамма.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.

Результаты исследования

Модель летального пневмококкового сепсиса у мышей

Интраназальное заражение мышей линии BALB/c культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀ приводит к быстрому развитию пневмонии и сепсиса и 100%-й гибели животных в течение 4 суток.

Результаты бактериологического анализа показали, что интраназальное введение культуры штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 вызывает у мышей линии BALB/c генерализованную инфекцию (табл. 2). Через 3 ч после заражения пневмококки в большом количестве определялись в легких мышей. В это же время бактерии проникали в головной мозг и почки животных, но концентрация патогена в этих органах была невысокой. Несмотря на начавшуюся инвазию клеток пневмококка из респираторного тракта в различные органы, бактериемия у мышей отсутствовала. Через 12 ч происходило некоторое снижение обсемененности легких, но увеличивалось содержание пневмококков в головном мозге и почках. В селезенке культура пневмококка была выявлена только через 24 ч после заражения. Уровень ее обсемененности в это время был достаточно высоким и продолжал расти в течение следующих суток (концентрация клеток *S. pneumoniae* ATCC 630 увеличилась на порядок).

Важно отметить, что, несмотря на быструю колонизацию пневмококками органов, пневмококковая бактериемия была выявлена у 4 из 5 мышей только через 12 ч после инфицирования. Затем обсемененность крови клетками *S. pneumoniae* ATCC 6305 возрастала и ко 2-м суткам инфекции составляла 7,08 LOG₁₀ КОЕ/г.

Общий анализ крови мышей, зараженных интраназально культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, показал, что через

Таблица 3. Результаты клинического анализа крови мышей BALB/c, проведенного через 48 ч после интраназального заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀
Table 3. Results of clinical blood analysis of BALB/c mice, carried out 48 hours after intranasal infection with *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture at a dose of 40 LD₅₀

Показатель / Indicator	Ед. измерения / Unit of measurement	Интактные мыши (контроль) / Intact mice (control)	Инфицированные мыши / Infected mice	p-value*
1	2	3	4	5
Лейкоциты / Leukocytes	×10 ⁹ /л	5,0 ± 1,2	2,2 ± 1,8	<0,05
Лимфоциты / Lymphocytes	×10 ⁹ /л	3,5 ± 0,8	0,8 ± 0,9	<0,005
Моноциты / Monocytes	×10 ⁹ /л	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	>0,05
Гранулоциты / Granulocytes	×10 ⁹ /л	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,8	>0,05
Лимфоциты / Lymphocytes	%	68,7 ± 6,7	31,5 ± 7,9	<0,0005
Моноциты / Monocytes	%	4,5 ± 0,9	5,8 ± 1,5	>0,05
Гранулоциты / Granulocytes	%	26,8 ± 5,9	62,7 ± 8,9	<0,001
Эритроциты / Erythrocytes	×10 ¹² /л	9,00 ± 0,5	9,77 ± 1,35	>0,05
Гемоглобин / Hemoglobin	г/л	119 ± 12	135 ± 20	>0,05
Гематокрит / Hematocrit	%	39,7 ± 3,9	46,0 ± 6,5	>0,05
Тромбоциты / Thrombocytes	×10 ⁹ /л	957 ± 401	220 ± 232	<0,03
Тромбокрит / Thrombocrit	%	0,432 ± 0,179	0,114 ± 0,114	<0,03

*уровень значимости отличий от контроля для выбранной временной точки; число животных в группе – 5; жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему t-критерию Стьюдента. / *significance level of differences from control for the selected time point; number of animals in a group – 5; values that are statistically significantly different from the control are shown in bold; all comparisons were performed using a two-tailed Student's t-test.

2 суток у мышей развивается лейкоцитопения и лимфоцитопения. Среди других статистически значимых изменений

гематологических показателей крови у инфицированных животных следует отметить четырехкратное снижение уровня тромбоцитов и тромбокрита (табл. 3).

Сыворотки крови мышей, инфицированных культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, исследовали на содержание общего белка, глюкозы, креатинина, АСТ, АЛТ и ЩФ. Биохимический анализ сывороток крови мышей с пневмококковой инфекцией показал, что через 48 ч после заражения в 2 раза повышается уровень АСТ. С другой стороны, у животных почти в 2 раза снижалось содержание ЩФ (табл. 4). Средние концентрации общего белка, креатинина, глюкозы и АЛТ в сыворотках крови инфицированных мышей значимо не отличались от контроля (сыворотки интактных животных), хотя и имелась тенденция к отклонению от нормы.

Выявленные у инфицированных животных отклонения биохимических показателей крови свидетельствуют о серьезном нарушении функции печени и поджелудочной железы, которые напрямую связаны с развитием у них пневмококкового сепсиса.

Через 48 ч после интраназального заражения летальной дозой *S. pneumoniae* ATCC 6305 (40 ЛД₅₀) было проведено гистологическое исследование легких, печени, селезенки, тимуса, паховых лимфатических узлов, головного мозга и почек мышей BALB/c с целью выявления патологических изменений.

Таблица 4. Результаты биохимического анализа сывороток крови мышей BALB/c, проведенного через 48 ч после интраназального заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀

Table 4. Results of biochemical analysis of blood serum of BALB/c mice, carried out 48 hours after intranasal infection with *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture at a dose of 40 LD₅₀

Показатель / Indicator	Интактные мыши (контроль)* / Intact mice (control)*	Инфицированные мыши* / Infected mice*
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	71,2 ± 12,6	62,4 ± 6,4
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol/l	5,08 ± 1,9	3,19 ± 0,06
АСТ, МЕ/л / AST, IU/l	148,9 ± 34,6	287,6 ± 64,7
АЛТ, МЕ/л / ALT, IU/l	40,9 ± 10,2	51,7 ± 26,2
Креатинин, мкмоль/л / Creatinine, μmol/l	38,7 ± 3,9	46,6 ± 3,8
Щелочная фосфатаза, МЕ/л / Alkaline phosphatase, IU/l	448,9 ± 102,0	240,1 ± 43,6

*результаты анализа пула сывороток от пяти мышей в группе. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от контроля. / *results of analysis of a pool of sera from five mice per group. Values in bold are significantly ($p < 0,05$) different from the control.

Легкие. Микроскопическое изучение гистологических срезов легких выявило в них выраженные патологические изменения. Просветы бронхов разного калибра заполнены

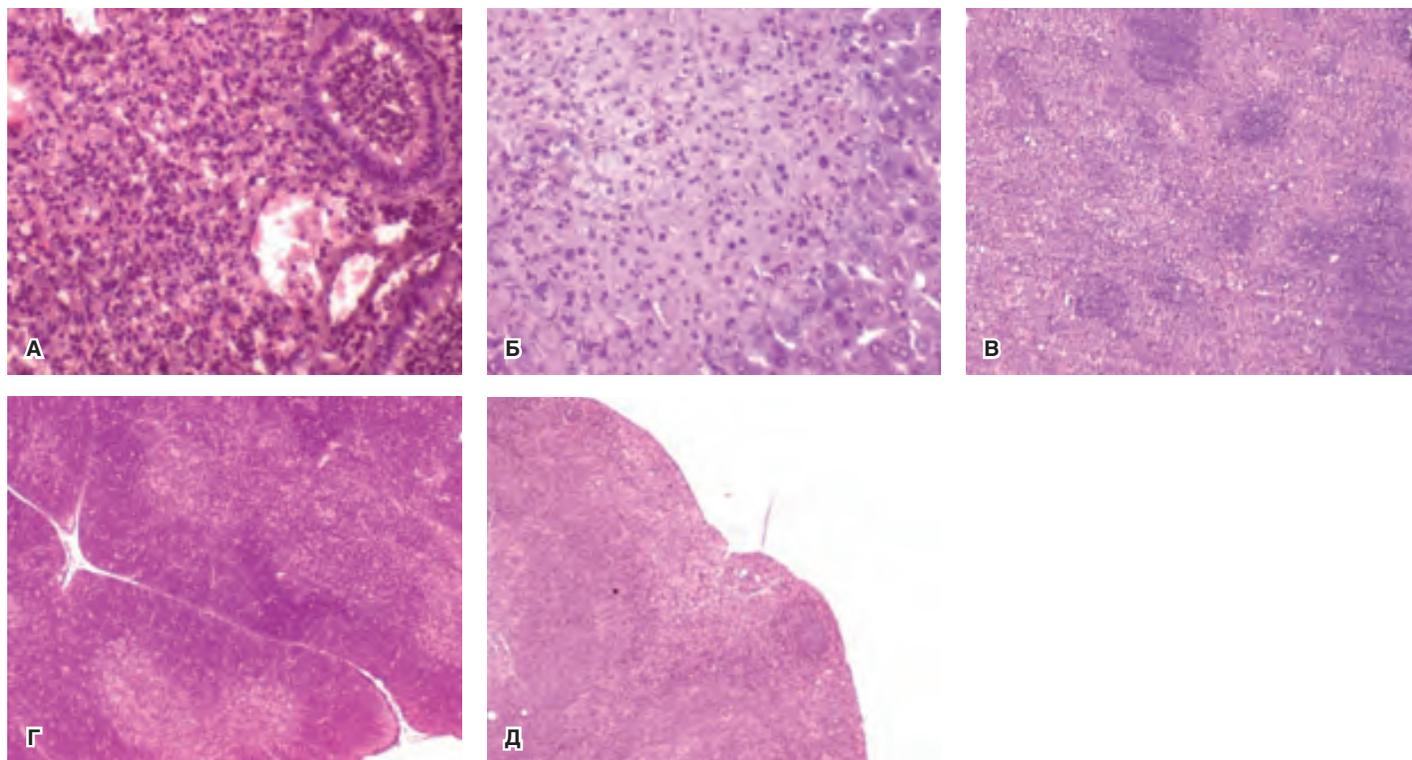


Рис. 1. Микрофотографии органов мышей BALB/c, инфицированных интраназально культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, 48 ч после заражения: А – легкие. Воспалительный клеточный инфильтрат в бронхах и паренхиме. Увеличение 20×; Б – печень. Обширный очаг некроза. Увеличение 20×; В – селезенка. Лимфатические фолликулы уменьшенного размера, состоят из малого количества лимфоцитов. Увеличение 10×; Г – тимус. Значительное уменьшение ширины коркового вещества. Увеличение 10×; Д – лимфатический узел. Центры размножения в лимфатических фолликулах отсутствуют. Увеличение 10×.

Fig. 1. Photomicrographs of organs of BALB/c mice infected intranasally with *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture. 48 hours after infection: A – lungs. Inflammatory cellular infiltrate in the bronchi and parenchyma. Magnification 20×; B – liver. Extensive focus of necrosis. Magnification 20×; C – spleen. Lymphatic follicles are reduced in size, consist of a small number of lymphocytes. Magnification 10×; D – thymus. Significant decrease in the width of the cortex. Magnification 10×; E – lymph node. Reproductive centers are absent in the lymphatic follicles. Magnification 10×.

скоплениями нейтрофилов, между которыми встречаются микробные клетки. В некоторых бронхах имеется большое количество слизи. Эпителиальный слой бронхов без повреждений. В слизистой оболочке бронхов воспалительно-клеточной инфильтрации не выявлено. В паренхиме легких имеется обильная клеточная инфильтрация межальвеолярных перегородок, в просвете альвеол также видны скопления клеток, что приводит к исчезновению альвеолярного строения. Клеточный инфильтрат состоит из макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов и единичных базофилов. Отмечается наличие большого количества микробов в очагах клеточной инфильтрации (рис. 1А).

Печень. В ткани печени имеется множество обширных участков из гепатоцитов в состоянии дегенерации и некроза. Ядра клеток сжаты, гиперхромные. В некоторых клетках отмечается лизис ядер. Цитоплазма гепатоцитов не окрашивается. В паренхиме, окружающей некротические очаги, определяются диффузно расположенные дегенерирующие клетки (рис. 1Б).

Селезенка. Площадь белой пульпы селезенки значительно уменьшена в результате уменьшения лимфатических фолликулов, у которых отсутствует маргинальная зона (рис. 1В). Центры размножения не определяются. Иногда на месте лимфатического фолликула сохраняется лишь небольшое скопление лимфоцитов. В красной пульпе находится довольно большое количество лимфоцитов и нейтрофилов. У некоторых животных в синусах селезенки обнаружены тромбы. В ряде случаев в красной пульпе выявляется большое количество разрушенных клеток.

Тимус. У большинства инфицированных мышей морфология долек тимуса аналогична микроскопическому строению тимуса интактных животных. Кортиковое вещество, расположенное по краевой части долек, состоит из большого количества плотно расположенных лимфоцитов. Мозговое вещество долек содержит меньшее количество лимфоцитов. Отличие тимуса мышей, зараженных пневмококком, от тимуса здоровых мышей заключается в истончении (прибли-

зительно в 2–3 раза) корковой зоны долек (рис. 1Г). У некоторых зараженных пневмококком животных количества лимфоцитов в корковом веществе встречаются лишь единичные лимфоциты, что говорит об усилении патологических процессов.

Лимфатический узел. Кортиковое вещество лимфатических узлов содержат единичные лимфатические фолликулы. Центры размножения не определяются. В паракортикальной зоне и мозговом веществе имеется большое количество лимфоцитов, что свидетельствует о повышенной иммунной активности органа. У части инфицированных мышей количество лимфоцитов в лимфоузлах значительно уменьшается. В результате становится видна строма.

В головном мозге и почках микроскопических отклонений от нормы не выявлено.

Антибиотикотерапия пневмококковой пневмонии

Пригодность разработанной модели летальной легочной инфекции, вызываемой штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, оценивали в экспериментах по антибиотикотерапии. Полученные результаты показали высокую эффективность ранней антибиотикотерапии, когда введения антибиотиков начинали через 3 ч после заражения. В результате все мыши, получавшие большую дозу левофлоксацина (100 мг/кг), выжили к 14-м суткам после заражения. Меньшая доза препарата (25 мг/кг) защищала от гибели 90% животных. Гибель 1 из 10 мышей в группе 2 произошла только на 11-е сутки инфекции.

Более позднее начало терапии (через сутки после заражения) приводило к худшему результату. В это время у мышей уже имелся выраженный пневмококковый сепсис. При этом эффективность терапии напрямую зависела от терапевтической дозы левофлоксацина. 90% мышей, которым вводили антибиотик в дозе 100 мг/кг (группа 3), оставались живыми в течение срока наблюдения. Лишь 1 животное умерло на 13-е сутки после инфицирования. Выживаемость мышей в группе 4, которым назначали меньшую дозу препарата (25 мг/кг), составила лишь 50%. Гибель животных

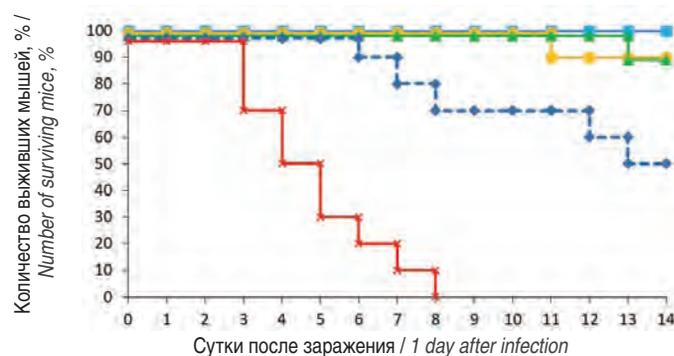


Рис. 2. Эффективность левофлоксацина (ЛФ) при лечении летальной инфекции у мышей BALB/c, вызванной интраназальным введением 40 ЛД₅₀ культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305.

Fig. 2. Efficacy of levofloxacin (LF) in the treatment of lethal infection in BALB/c mice caused by intranasal administration of 40 LD₅₀ *S. pneumoniae* ATCC 6305.

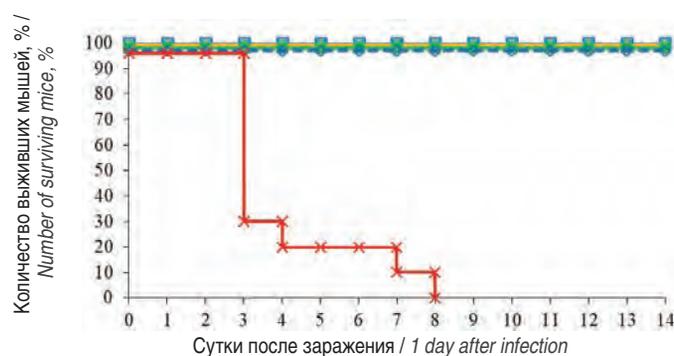


Рис. 3. Эффективность ампициллина (АМ) при лечении летальной инфекции у мышей BALB/c, вызванной интраназальным введением 40 ЛД₅₀ культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305.

Fig. 3. Efficacy of ampicillin (AM) in the treatment of lethal infection in BALB/c mice caused by intranasal administration of 40 LD₅₀ of *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture.

наблюдалась с 6-х по 13-е сутки. Все контрольные животные (без лечения) умерли в течение 8 суток после заражения (рис. 2).

Из внутренних органов всех павших мышей была выделена культура патогена – *S. pneumoniae* ATCC 6305. По данным бактериологического анализа, проведенного на 14-е сутки после заражения, во внутренних органах и крови всех выживших мышей культура пневмококка отсутствовала. Таким образом, эти животные были полностью санированы от пневмококка.

Результаты лечения пневмококковой пневмонии ампициллином оказались более высокими. Введение мышам этого антибиотика и в максимальной, и в минимальной разовых дозах независимо от сроков начала лечения защищало от гибели 100% мышей, тогда как контрольные мыши, не получавшие ампициллин, умирали в течение 8 суток (рис. 3). Бактериологический анализ органов всех выживших мышей не выявил у них носительства *S. pneumoniae* ATCC 6305.

Обсуждение

Мышиные модели пневмококковой инфекции широко используются исследователями для изучения патогенеза и для оценки лечебной эффективности различных антибактериальных препаратов [23–25]. Ранее мы также описали модель пневмококкового сепсиса у мышей линии BALB/c, вызываемого вирулентным штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305 и авирулентным штаммом *S. pneumoniae* M17 [26].

В этой статье мы представили экспериментальные данные, позволяющие воспроизводить летальную пневмококковую пневмонию у здоровых мышей. Описанная нами модель инфекции позволяет использовать ее для оценки лечебной эффективности антибактериальных препаратов. Многие вирулентные штаммы бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Streptococcus pneumoniae*, способны вызывать серьезную легочную инфекцию у здоровых мышей различных линий. В предварительных исследованиях мы отобрали наиболее вирулентный в отношении иммунокомпетентных мышей клинический штамм *S. pneumoniae*, относящийся к серогруппе 5, который после интраназального инфицирования вызывает у мышей тяжелую форму пневмонии, генерализацию инфекции и гибель животных. Известно, что среди штаммов пневмококков этой серогруппы встречаются высоковирулентные варианты [27]. Однако для моделирования смертельной пневмококковой пневмонии пригодны штаммы других серотипов – 1, 3, 6А и 8 [28]. В качестве модельных животных мы использовали мышей линии BALB/c, для которых ЛД₅₀ штамма ATCC 6305 при интраназальном введении составляет $4,5 \cdot 10^5$ КОЕ. Установлено, что инбредные мыши более восприимчивы к пневмококковой инфекции, так как не способны вырабатывать антитела к некоторым антигенам, включая пневмококковые капсульные полисахариды и другие тимуснезависимые антигены [29].

Благодаря достаточно высокой вирулентности тест-штамма мы выбрали для интраназального заражения дозу $2 \cdot 10^7$ КОЕ, которая соответствует 40 ЛД₅₀. Этого количества клеток достаточно, чтобы вызвать 100%-ю летальность у подопытных животных. Другие исследователи для достижения

летального эффекта вводят мышам более высокие дозы пневмококка [30]. Но даже высокие заражающие дозы не всегда приводят к 100%-му летальному исходу [31, 32]. В нашем случае гибель мышей наступала в течение 8 суток после интраназального заражения, что говорит о постепенном развитии пневмококковой инфекции у мышей, хотя уже в первые часы инфекции культура *S. pneumoniae* проникала не только в легкие, но и в головной мозг и почки. Через 12 ч у подопытных мышей появлялась бактериемия, а через сутки развивался выраженный сепсис. Максимальная обсемененность клетками тест-штамма легких, селезенки, головного мозга, почек и крови была выявлена на 2-е сутки инфекции, а через 3 дня после заражения среди животных начиналась гибель.

Как и другие исследователи [32], мы выявили, что летальная легочная инфекция приводит к лейкопении в периферической крови мышей. Количество лейкоцитов уменьшалось в среднем до $2,2 \cdot 10^9$ /л по сравнению с интактным контролем – $5 \cdot 10^9$ /л. Кроме того, у инфицированных мышей снижался уровень тромбоцитов – с $957 \cdot 10^9$ /л до $240 \cdot 10^9$ /л. Следует отметить, что при моделировании первичного сепсиса у мышей, вызываемого этим же штаммом пневмококка, отмечались такие же изменения в формуле крови [26].

Быстрое развитие сепсиса у мышей после интраназального заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 повлекло за собой нарушение функциональной активности печени. В ходе биохимического анализа сывороток крови мышей было установлено статистически значимое отклонение от нормы показателей АСТ и ЦФ. Средние значения концентрации глюкозы и креатинина в крови также начали смещаться в сторону патологии. Изменения биохимических показателей свидетельствует о функциональной недостаточности внутренних органов, которая приводит к летальному исходу пневмококковой инфекции.

Гистологические исследования органов мышей, проведенные через 48 ч после интраназального инфицирования культурой штамма ATCC 6305 в дозе $2 \cdot 10^7$ КОЕ, выявили выраженные патологические изменения в легких (воспалительный инфильтрат как в просвете бронхов, так и в межальвеолярном пространстве).

Штамм *S. pneumoniae* ATCC 6305 также вызывал образование в печени мышей множественных очагов некроза, что говорит о тяжести развивающейся пневмококковой инфекции.

Результаты микроскопического исследования органов мышей BALB/c, инфицированных интраназально летальной дозой (40 ЛД₅₀) культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305, показали развитие серьезных патологических изменений к 3-м суткам пневмококковой инфекции. В воздухоносных путях и респираторном отделе легких развивается воспаление с наличием множества нейтрофилов. В печени происходит дегенерация и некроз гепатоцитов. В органах иммунной системы уменьшается объем лимфоидной ткани. В лимфатических фолликулах селезенки и лимфатических узлов наблюдается снижение пролиферации В-клеток, а в корковой зоне в долях тимуса – Т-лимфоцитов.

J.E.Gotts et al [32] наблюдали похожую патологическую картину в легких мышей, инфицированных интраназально пневмококками серотипа 19F, но в большей дозе – $1 \cdot 10^8$ КОЕ.

На 7-е сутки инфекции в легких животных наблюдались серьезные изменения, связанные с обструкцией бронхов воспалительным экссудатом, отеком альвеолярных перегородок, интерстициальным и периваскулярным клеточным воспалением.

Пригодность разработанной нами модели летальной легочной пневмококковой инфекции у мышей мы оценивали в экспериментах по ее антибиотикотерапии. В качестве лечебных препаратов использовали антибиотик фторхинолонового ряда (левофлоксацин) и β -лактамы (ампициллин), которые обладают высокой активностью *in vitro*. Минимальная подавляющая концентрация левофлоксацина в отношении тест-штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 составляет 0,5 мкг/мл, а ампициллина – <0,008 мкг/мл. Левофлоксацин назначали в суточных дозах 100 и 25 мг/кг, ампициллин – 400 и 100 мг/кг. Выбранные нами дозировки антибактериальных препаратов были эквивалентны средним суточным человеческим дозам [33]. Кроме того, мы применяли два режима начала терапии – через 3 ч и через 24 ч после заражения подопытных животных. Выбор раннего срока начала лечения связан с тем, что через 3 ч после заражения инфекция начинает развиваться и локализуется только в легких (7,13 LOG₁₀ КОЕ/г), головном мозге (3,56 LOG₁₀ КОЕ/г) и у некоторых мышей в почках (2,91 LOG₁₀ КОЕ/г), а бактериемия отсутствует. Очевидно, что антибиотикотерапия в этот период может дать лучший лечебный результат. Более позднее начало лечения (через сутки после заражения), когда у всех животных наблюдается выраженный сепсис и высокая бактериальная нагрузка на легкие (6,54 LOG₁₀ КОЕ/г), селезенку (6,84 LOG₁₀ КОЕ/г), головной мозг (4,84 LOG₁₀ КОЕ/г), почки (5,77 LOG₁₀ КОЕ/г) и кровь (6,7 LOG₁₀ КОЕ/г), ухудшает прогноз заболевания. Тем не менее результаты экспериментального лечения летальной пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c, вызываемой штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, дали хорошие результаты. В случае левофлоксацина наблюдался дозозависимый эффект: большая доза защищала от гибели 90–100% мышей (в зависимости от срока начала терапии), меньшая доза – 50–90% мышей. Активность *in vivo* ампициллина оказалась максимальной: выжили все инфицированные животные. В то же время все мыши, не получавшие антибиотикотерапии, погибали в течение 8 суток после заражения. Следует отметить, что у 100% выживших мышей возбудитель инфекции – *S. pneumoniae* ATCC 6305 – элиминировал из организма.

Заключение

В результате работы была изучена и апробирована модель летальной пневмонии, вызываемой вирулентным штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305. Экспериментальная пневмококковая инфекция поддается лечению антибиотиками и может быть использована для оценки терапевтической эффективности различных антибактериальных препаратов, предназначенных для борьбы с пневмококковой инфекцией.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Tchidjou HK, Vescio F, Boros S, Guemkam G, Minka E, Lobe M, et al. Seasonal pattern of hospitalization from acute respiratory infections in Yaoundé, Cameroon. *J Trop Pediatr*. 2010 Oct;56(5):317-20. DOI: 10.1093/tropej/fmp127
2. Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018
3. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al.; Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009 Sep 12;374(9693):893-902. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6
4. Chen Y, Williams E, Kirk M. Risk factors for acute respiratory infection in the Australian community. *PLoS One* 2014;9(7):e101440. DOI: 10.1371/journal.pone.0101440
5. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews. Microbiology*. 2018;16(6):355-367. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
6. Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Hardy DJ, Swanson RN, Pocidalo JJ. Antipneumococcal activity of ciprofloxacin, oxofloxacin and temafloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. *J Infect Dis*. 1991;163(2):319-324. DOI: 10.1093/infdis/163.2.319/
7. Trolle S, Chachaty E, Kassis-Chikhani N, Wang C, Fattal E, Couvreur P, et al. Intranasal immunization with protein-linked phosphorylcholine protects mice against a lethal intranasal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. 2000;18(26):2991-2998. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00089-X
8. Lacy M, Nicolau DP, Banevicius MA, Nightingale CH, Quintiliani R. Protective effect of trovafloxacin, ciprofloxacin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44(4):477-481. DOI: 10.1093/jac/44.4.477
9. Melhus Å, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS*. 2003;111(10):989-994. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x
10. Djukic M, Böttcher T, Wellmer A, Gerber J, Brocke VV, Eiffert H, et al. Moxifloxacin in experimental *Streptococcus pneumoniae* cerebritis and meningitis. *Neurocrit Care*. 2005;2(3):325-329. DOI: 10.1385/NCC:2:3:325
11. Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso JM. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')₂ fragments administered intranasally. *J Infect Dis*. 1996;173(5):1123-1128. DOI: 10.1093/infdis/168.4.1030/
12. Rubins JB, Charboneau D, Fasching C, Berry AM, Paton JC, Alexander JE, et al. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(4):1339-1346. DOI: 10.1164/ajrccm.153.4.8616564
13. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis*. 1995;172(1):119-123. DOI: 10.1093/infdis/172.1.119
14. Nuermberger E, Helke K, Bishai WR. Low-dose aerosol model of pneumococcal pneumonia in the mouse: utility for evaluation of antimicrobial efficacy. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26(6):497-503. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.08.022

15. Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Pocard JJ. Comparative activity of fluorinated quinolones in acute and subacute *Streptococcus pneumoniae* pneumonia models: efficacy of temafloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1991;28(SupplC):45-53. DOI: 10.1093/jac/28.suppl_c.45
16. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by deficiency of pneumolysin and by differences in serotype. *Infect Immun.* 2002;70(6):2886-2890. DOI: 10.1128/IAI.70.6.2886-2890.2002
17. Kim J-Y, Seo S-M, Lee H-K, Kim H-W, Choi Y-K. Comparison of the virulence of *Streptococcus pneumoniae* in ICR mouse stocks of three different origins. *Laboratory Animal Research.* 2019;35:5. DOI: 10.1186/s42826-019-0002-4
18. Крышень КЛ, Кухаренко АЕ, Вичаре АС, Гайдай ЕА, Крышень АА, Гушин ЯА, и др. Противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты бактериального лизата на моделях асептического лимфаденита и пневмококковой пневмонии *in vivo*. *Медицинская иммунология.* 2020;22(1):111-122. / Kryshen KL, Kukharenko AE, Vichare AS, Gaidai EA, Kryshen AA, Gushchin YaA, et al. Anti-inflammatory and immunomodulating effects of the bacterial lysate in the *in vivo* models of aseptic lymphadenitis and pneumococcal pneumonia. *Medical Immunology (Russia).* 2020;22(1):111-122. DOI: 10.15789/1563-0625-AAI-1758 (In Russian).
19. Weber SE, Haijun T, Pirofski L-A. CD8+ Cells Enhance Resistance to Pulmonary Serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. *Immunol.* 2011;186(1):432-442. DOI: 10.4049/jimmunol.1001963
20. Wang E, Bergeron Y, Bergeron MG. Ceftriaxone pharmacokinetics in interleukin-10-treated murine pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(5):721-726. DOI: 10.1093/jac/dki085
21. Andonegui G, Goring Kim, Liu D, McCafferty D-M, Winston BW. Characterization of *S. pneumoniae* pneumonia-induced multiple organ dysfunction syndrome: an experimental mouse model of gram-positive sepsis. *Shock.* 2009;31(4):423-8. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318188c273
22. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):288-301. DOI: 10.1038/nrmicro1871
23. De Hennezel L, Ramisse F, Binder P, Marchal G, Alonso JM. Effective combination therapy for invasive pneumococcal pneumonia with ampicillin and intravenous immunoglobulins in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:316-318. DOI: 10.1128/AAC.45.1.316-318.2001
24. Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, Berg J, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, et al. Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:830-840. DOI: 10.1093/jac/dku446
25. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Перескокова ЕС, Ганина ЕА. Мышиные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*. *Бактериология.* 2023;8(1):7-16. / Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Pereskokova ES, Ganina EA. Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Bacteriology.* 2023;8(1):7-16. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-7-16 (In Russian).
26. Aaberge IS, Eng J, Lemark G, Løvik M. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb Path.* 1995;18(2):141-152. DOI: 10.1016/S0882-4010(95)90125-6
27. Saeland E, Vidarsson G, Jonsdottir I. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. 2000;29(2):81-91. DOI: 10.1006/mpat.2000.0363
28. Borsa N, Pasquale M, Restrepo M. Animal Models of Pneumococcal pneumonia. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4220. DOI: 10.3390/ijms20174220
29. Zhang X, Cui J, Wu Y, Wang H, Wang J, Qiu Y, et al. *Streptococcus pneumoniae* Attenuated Strain SPY1 with an Artificial Mineral Shell Induces Humoral and Th17 Cellular Immunity and Protects Mice against Pneumococcal Infection. *Front Immunol.* 2018;8:1983. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01983
30. Ngwa DN, Singh SK, Gang TB, Agrawal A. Treatment of Pneumococcal Infection by Using Engineered Human C-Reactive Protein in a Mouse Model. *Front Immunol.* 2020 Oct 7;11:586669. DOI: 10.3389/fimmu.2020.586669
31. Gotts JE, Bernard O, Chun L, Croze RH, Ross JT, Nessler N, et al. Clinically relevant model of pneumococcal pneumonia, ARDS, and nonpulmonary organ dysfunction in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2019 Nov 1;317(5):L717-L736. DOI: 10.1152/ajplung.00132.2019
32. Majhi A, Adhikary R, Bhattacharyya A, Mahanti S, Bishayi B. Levofloxacin-ceftriaxone combination attenuates lung inflammation in a mouse model of bacteremic pneumonia caused by multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* via inhibition of cytolytic activities of pneumolysin and autolysin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Sep;58(9):5164-80. DOI: 10.1128/AAC.03245-14
33. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. М., 2003. / Gus'kova TA. Toksikologiya lekarstvennykh sredstv. M., 2003. (In Russian).

Информация о соавторах:

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

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

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

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

Information about co-authors:

Olga V. Korobova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatyana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elena A. Ganina, Researcher of the laboratory of nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Диагностика завозного случая лепры в России с использованием серологических методов и бактериоскопии

А.Г.Королёва-Ушакова, Е.В.Баранова, Е.А.Ганина, А.Г.Шевяков, М.В.Храмов, С.Ф.Бикетов, И.А.Дятлов

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

Лепра – гранулематозное хроническое заболевание, вызываемое *Mycobacterium leprae*, поражающее в первую очередь периферические нервы и кожу, нередко приводящее к инвалидизации. Важнейшим инструментом лабораторного контроля лепры является иммунодиагностика. Нами был получен биологический материал из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» от трех пациентов, один из которых имел явные клинические признаки заболевания лепрой (уроженец Республики Чад, Центральная Африка), два других (контактных) пациента их не имели. Пациенту с клиническими признаками поражения кожи и нервов был поставлен предварительный диагноз «лепра». Позже нами были получены сыворотки от контактных лиц для проведения серологических исследований. В данной работе мы провели иммунодиагностику сывороток данных пациентов в формате иммуноферментного и иммунохроматографического анализов и осуществили микроскопию мазков из носоглотки и пораженных тканей подозрительного по лепре пациента и мазков из носоглотки контактных с ним лиц. В сыворотке крови пациента с характерными для лепры клиническими признаками и у четырех контактных с ним пациентов без клинических признаков обнаружены специфические антитела к *M. leprae* в серологических исследованиях. У одного из пациентов в биоматериале из носоглотки при микроскопии мазка обнаружены специфические фуксифильные микобактерии.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, лепра, *Mycobacterium leprae*, фенольный гликолипид-1, серологическая иммунодиагностика, микроскопия

Для цитирования: Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Ганина Е.А., Шевяков А.Г., Храмов М.В., Бикетов С.Ф., Дятлов И.А. Диагностика завозного случая лепры в России с использованием серологических методов и бактериоскопии. Бактериология. 2024; 9(3): 37–45. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-37-45

Diagnosics a case of leprosy imported to the Russian Federation using serologic methods and bacterioscopy

A.G.Korolyova-Ushakova, E.V.Baranova, E.A.Ganina, A.G.Shevyakov, M.V.Khramov, S.F.Biketov, I.A.Dyatlov

«State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» of Rosпотребнадzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

Leprosy is a granulomatous chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, primarily affecting the peripheral nerves and skin, often resulting in disability. Immunodiagnosis is the most important tool for laboratory control of leprosy. We received biological material from the Center of Hygiene and Epidemiology in Moscow from three patients, one of whom had obvious clinical signs, the other two patients did not have them. The patient with clinical signs of skin and nerve lesions was given a preliminary diagnosis of leprosy. Later we obtained sera from the contacts for serologic studies in the amount of 37 pieces. In this study, we immunodiagnosed the sera of these patients by ELISA and ICA and performed microscopy of nasopharyngeal and lesion swabs from the nasopharynx of a leprosy-suspect patient and nasopharyngeal swabs from his contacts. Specific antibodies to *M. leprae* were detected in the serum of a patient with clinical signs characteristic of leprosy and in four contact patients without clinical signs in serologic tests. In one of the patients, specific mycobacteria were detected in the nasopharyngeal biomaterial by smear microscopy.

Key words: ELISA, immunochromatographic analysis, leprosy, *Mycobacterium leprae*, phenolic glycolipid-1, serological immunodiagnosics, microscopy

For citation: Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ganina E.A., Shevyakov A.G., Khramov M.V., Biketov S.F., Dyatlov I.A. Diagnosics a case of leprosy imported to the Russian Federation using serologic methods and bacterioscopy. Bacteriology. 2024; 9(3): 37–45. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-37-45

Для корреспонденции:

Королёва-Ушакова Анжела Григорьевна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-01-47

Статья поступила 04.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Anzhela G. Koroleva-Ushakova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-01-47

The article was received 04.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

Лепра – гранулематозное хроническое заболевание, вызываемое *Mycobacterium leprae*, поражающее в первую очередь периферические нервы и кожу, нередко приводящее к инвалидизации [1].

Лепру называют «великим имитатором», способным имитировать многие болезни кожи и периферической нервной системы. Поражение кожи при данном заболевании может быть одиночным или множественным, обычно менее пигментированным, чем окружающая нормальная кожа. Иногда поражение бывает красноватого или медного цвета. Поражения кожи могут быть различными: в виде папул, макул, узелков. Потеря чувствительности является типичным признаком. Утолщенные нервы, главным образом периферические нервные стволы, представляют собой еще одну особенность лепры. Утолщенный нерв часто сопровождается другими признаками в результате повреждения нерва. Это может быть потеря поверхностной чувствительности и слабость мышц, иннервируемых пораженным нервом. Наиболее уязвимы болевые и температурные рецепторы. Вегетативная дисфункция выражается в виде изменения окраски (мраморности, синюшности, пигментации), отека, сухости, потери эластичности кожи, волос, ослаблении или отсутствии местного и рефлексорного дермографизма, пилomotorного рефлекса. Такой же серьезной проблемой, существенно влияющей на качество жизни, становится образование длительно текущих, плохо поддающихся лечению безболезненных трофических язв, образующихся на подошвенной поверхности стоп [2, 3].

Раннее, опережающее вовлечение в патологический процесс до появления кожных изменений рецепторного аппарата и чувствительных волокон периферических нервов – существенная часть клинической картины лепры. Более того, заболевание может проявляться только в виде невропатий при отсутствии кожных симптомов (чисто невральная форма лепры). При неврологическом осмотре пациента на кожных элементах выявляются «островки» гипестезии, анестезии, лабильных чувствительных расстройств, причинно связанных с локальным поражением сенсорных ветвей кожных нервов. Современные инструменты исследования позволяют с достаточной точностью определить границы зон расстройства чувствительности. Неравномерное поражение мышечного аппарата, преимущественно сгибателей и разгибателей верхних конечностей, изменяет координационный синергизм при сокращении/расслаблении мышц, способствует формированию типичных для больных лепрой деформаций и контрактур (рука «пастера», «когтистая», «обезьянья», «флажковая» кисть, кисть типа «лодочки», «свисающая» стопа). Несмотря на их наличие, потерю тактильной чувствительности, способность выполнять работу, требующую точности движений, не теряется, т.к. глубокая чувствительность сохраняется «поразительно хорошо». В отличие от полиневропатий другого генеза сухожильные и периостальные рефлексы обычно не угасают [3, 4].

Наряду с образованием в костной ткани хронических воспалительных лепрозных гранул развиваются остеопороз, остеолит, деструкция костной ткани, деформация пальцев, обусловленная подвывихами, переломами концевых и основных фаланг. Наиболее выраженные структурные изменения архитектоники костной ткани и суставов имеются у

больных с нейропатической остеоартропатией Шарко, мутиляцией фаланг пальцев кистей и стоп при давлении на передние точки опоры и пятку. Из-за этого и наличия изъязвлений на коже при распаде лепром в дошедших из глубины веков медицинских трактатах больного лепрой называли «человек, гниющий заживо» [5].

В рекомендациях Всемирной организации здравоохранения диагноз «лепра» ставят на основе наличия одного или нескольких из трех признаков: потеря чувствительности в (гипопигментированном) пятне на участках кожи; утолщение периферических нервов с потерей чувствительности, мышечной слабости, связанной с повреждением нерва, иннервирующего этот участок; или присутствие кислотоустойчивых бацилл в гистологическом срезе кожи и определение бактериального индекса – количества кислотоустойчивых бацилл в дерме. Для этого проводится биопсия кожи и мазков с кожных срезов (skin-slit smears), которые используются для непосредственного обнаружения *M. leprae* и позволяют определить бактериальный индекс [1]. Бактериоскопическое исследование имеет решающее значение при получении положительных результатов при подозрении на лепроматозный или погранично-лепроматозный тип [6]. При туберкулоидном и погранично-туберкулоидном типе микобактерии могут не выявиться.

Также в целях диагностики используют лепроминовую пробу, или пробу Митсуды (Мицуды) – показатель способности хозяина поддерживать в своем организме клеточный иммунитет к *M. leprae*. Используют лепромин. Отрицательная реакция Митсуды обычно наблюдается у пациентов с многобактериальным типом лепры и указывает на отсутствие защитного клеточного ответа. Внутрикожная реакция Митсуды состоит из выполнения внутрикожной инъекции антигена лепромин (синтезированного из *M. leprae*) на сгибательной поверхности предплечья. Реакция Митсуды выражает уровень клеточного иммунитета и представляет собой экстеризацию туберкулоидной гранулемы, наблюдаемую при гистопатологических исследованиях. Данная реакция помогает классифицировать клиническую форму заболевания, но не позволяет поставить диагноз. Также применяют функциональные пробы для проверки температурной, тактильной, болевой чувствительности [1].

Для дополнительной диагностики лепры также используется молекулярно-генетический метод (полимеразная цепная реакция), который позволяет подтвердить диагноз лепры наличием ДНК *M. leprae* в очагах поражения [7, 8].

Важнейшим инструментом лабораторного контроля лепры является иммунодиагностика. Клиническая постановка диагноза ранней стадии лепры или олигобациллярной лепры может быть проблематичной. Поэтому в дополнение к вышеуказанным методам были разработаны и другие методы диагностики, такие как иммуноферментный и иммунохроматографический методы анализа (ИФА, ИХА) [9–12]. В частности, во ФБУН ГНЦ ПМБ в 2013 г. был разработан иммунохроматографический серотест для экспресс-диагностики лепры, основанный на химически синтезированном аналоге компонента клеточной стенки – фенольном гликолипиде 1 (ФГЛ-1). Этот серотест был успешно применен в данном исследовании. На основе ФГЛ-1 был осуществлен и ИФА. В наших исследованиях мы осуществили качественное определение со-

держания антител человека IgG, IgM, IgA против *M. leprae* в ИФА и IgM в ИХА и определили наличие кислотоустойчивых микобактерий в скарификатах методом микроскопии.

Материалы и методы

В работе использовали иммунобиохимические и микроскопические методы. Материалом для исследований послужили сыворотки крови от 40 пациентов, один из которых имел характерные для лепры клинические признаки (остальные 39 – контактные с ним лица, не имевшие клинических признаков), а также биоматериал из носоглотки данных пациентов.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки готовили в стерильных условиях, исключая возможность бактериального загрязнения. Каждый образец сыворотки или раствора отбирали новым наконечником.

В работе применяли иммунобиохимические и микроскопические методы исследования. Работы проводились на базе отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск.

Проведение иммуноферментного анализа. Антиген на основе ФГЛ-1 с бычьим сывороточным альбумином (БСА) [13, 14] (получен методом химического синтеза сотрудниками Института органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)) разводили до 0,5 мг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 («ПанЭко», Россия). По 0,1 мл разбавленного антигена добавляли в лунки 96-луночного планшета (Nunc, MaxiSorp, Дания) и выдерживали в течение ночи при 4°C. Далее промывали планшет фосфатным буфером с твином (ФСБ-Т) 2 раза. Вносили в каждую лунку по 0,2 мл блокирующего реагента (5%-е обезжиренное сухое молоко) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Промывали планшет ФСБ-Т 2 раза. Вносили в лунки планшета сыворотки, разведенные 1:200, и инкубировали 1 ч при 37°C. В лунку планшета А1 вносили 0,1 мл рабочего буферного раствора (ФБР, используется как бланк). Для контроля вносили отрицательную контрольную сыворотку в рабочем разведении (К-) и положительную контрольную сыворотку в рабочем разведении (К+) объемом 0,1 мл. В остальные лунки планшета вносили по 0,1 мл исследуемых сывороток в рабочем разведении. Инкубировали на шейкере 1 ч при 37°C. Промывали планшет ФСБ-Т 3 раза. Вносили в лунки планшета по 0,1 мл рабочего разведения пероксидазного конъюгата кроличьих антител против человеческих Ig (A, G, M) (Sigma, США) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Промывали планшет ФСБ-Т 4 раза. Вносили в лунки планшета по 0,1 мл свежеприготовленного субстратного раствора (двухкомпонентная хромогенная система тетраметилбензидин – субстратный буфер в соотношении 1:1). Ферментативную реакцию останавливали после развития синей окраски добавлением 0,05 мл 1 М H₂SO₄ («Диам», Россия). Регистрировали оптическую плотность (ОП) раствора при λ = 450 нм с помощью планшетного фотометра («Униплан», «Пикон», Россия). Нулевой уровень (бланк) устанавливали по лунке А1.

Проведение иммунохроматографического анализа. Для проведения ИХА использовали набор реагентов для

ускоренной серодиагностики лепры («Серотест Лепра») производства ФБУН ГНЦ ПМБ (РУ от 22 апреля 2014 г. РЗН 2014/1571, серия 11, произведен 26.06.2023). Набор реагентов «Серотест Лепра» предназначен для экспресс-скрининга сыворотки крови человека на наличие специфических антител IgM к возбудителю. В качестве антигенной подложки использовали антиген *M. leprae* на основе ФГЛ-1, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином (получен методом химического синтеза сотрудниками ИОХ РАН).

Набор реагентов представляет собой сборную пластиковую кассету с тест-полоской внутри. Кассета оснащена двумя окошками (приемочное – для исследуемого образца, тестовое – для визуального учета результата). На лицевой стороне кассеты имеется маркировка «Серотест Лепра». Специфические антитела, присутствующие в исследуемой сыворотке крови, взаимодействуют с мечеными золотом антителами к иммуноглобулинам человека класса М, образуя окрашенный комплекс с последующим его накоплением в тестовой зоне. Учет результата проводят визуально. «Серотест Лепра» обеспечивает выявление IgM антител к *M. leprae* в сыворотке крови человека в 70% случаев лепроматозной формы заболевания и в 30% – туберкулоидной формы. Необходимый объем сыворотки крови для проведения одного анализа составляет 10 мкл. Для проведения анализа вскрыли пакет, извлекли необходимое количество тестов и выдержали при комнатной температуре (22 ± 2°C) 15 мин. С помощью пипетки внесли в круглую лунку кассеты не менее 10 мкл исследуемой сыворотки и добавили 0,1 мл ФСБ, pH = 7,4. Время реакции – 20 мин. Интенсивность линий при интерпретации результата (табл. 1) не учитывается.

Далее мы сравнили результаты ИХА с тестами производства ФБУН ГНЦ ПМБ и экспериментальной серией зарубежных ИХ-тестов ML Flow, lot 7/002, 05/2015 IPTSP/UFQ, производства Бразилия. Результат совпал во всех случаях.

Микроскопия мазков. Окраску фиксированных над пламенем спиртовки мазков проводили по методу Циля–Нильсена. Для этого использовали «Набор реагентов для окраски срезов и мазков по Цилю-Нильсену» (ООО «Лабико», Санкт-Петербург, Россия). Сначала поместили фиксированные мазки в раствор йодной кислоты на 10 мин, затем промыли в дистиллированной воде и поместили их в карболовый фуксин Циля на 30 мин. Тщательно промыли мазки в нескольких сменах дистиллированной воды и просушили фильтровальной бумагой. Далее использовали диф-

Таблица 1. Интерпретация результатов
Table 1. Interpretation of the results

Положительный результат / <i>Positive result</i>	Наличие видимых глазом двух окрашенных линий в зонах «Т» и «К»/ <i>The presence of two colored lines visible to the eye in the «T» and «K» zones</i>
Отрицательный результат / <i>Negative result</i>	Наличие окрашенной линии только в зоне «К»/ <i>The presence of a colored line only in the «K» zone</i>
Тест не работает / <i>The test does not work</i>	Отсутствие окрашенной линии в зоне «К»/ <i>The absence of a colored line in the «K» zone</i>
Тест не работает / <i>The test does not work</i>	Полное отсутствие окрашенных линий/ <i>Complete absence of colored lines</i>

Таблица 2. Оценка результатов иммуноферментного анализа Table 2. Evaluation of the results of enzyme immunoassay	
КС <0,9 / Serum control <0,9	Отрицательный результат. Указывает, что тестируемый образец не содержит антител к возбудителю лепры либо уровень антител не детектируется / Negative result. <i>Indicates that the test sample does not contain antibodies to the causative agent of leprosy, or the level of antibodies is not detected</i>
КС 0,9-1,1 / Serum control 0,9 1,1	Сомнительный результат «серая зона». Повторить анализ. При повторном получении промежуточного значения отобрать новый образец сыворотки крови у пациента и проанализировать / The dubious result is a «gray zone». Repeat the analysis. <i>Upon repeated receipt of the intermediate value, take a new blood serum sample from the patient and analyze</i>
КС >1,1 / Serum control >1,1	Положительный результат / Positive result

ференцирующий раствор в течение 5 мин с последующим промыванием в нескольких сменах дистиллированной воды. Затем докрашивали мазки метиленовым синим с экспозицией 5 мин и последующим промыванием дистиллированной водой. После удаления излишка влаги провели микроскопическое исследование на микроскопе (Nikon, Eclips 80i, Германия) при рабочем увеличении окуляров ×20 и объектива ×20 (фотонасадка Nikon Digital Imaging Head, Германия).

Результаты исследования

Результаты ИФА. Качество реакции ИФА оценивали при ОП в лунках с отрицательным контролем (ОП К_{ср-}) – не более 0,2 оптических единиц (о.е.), а в лунке с положитель-

ным контролем значение ОП (ОП К_{ср+}) не менее 0,9 о.е. Результаты анализа (табл. 2) оценивали по коэффициенту серопозитивности (КС), рассчитываемому по формуле:

$$КС = \frac{ОП_{образца}}{ОП_{крит}}, \text{ где } ОП_{крит} = ОП_{К_{ср-}} + 0,1.$$

В сыворотке крови пациента с характерными для лепры клиническими признаками содержались специфические антитела к *M. leprae*. Коэффициент серопозитивности сыворотки данного пациента на подложке с ФГЛ-1 (КС_{ФГЛ-1}) составил 2,4. У четырех пациентов из числа контактных коэффициенты серопозитивности составили 1,2; 2,0; 1,15 и 0,97. ИФА сывороток крови данных пациентов показал наличие специфических антител к возбудителю лепры.

Результаты ИХА. Все пять сывороток в ИХА с использованием набора для серодиагностики лепры (ФБУН ГНЦ ПМБ) (рис. 1а, в) и набора ML Flow (Бразилия) (рис. 2) имели положительный результат с разной степенью интенсивности окрашивания тестовых полос.

Все остальные сыворотки контактных пациентов (35 сывороток) показали в ИХА отрицательный результат.

Результаты микроскопии. У одного из серопозитивных пациентов, не имеющих характерных для лепры клинических признаков, в мазках из носоглотки обнаружены специфические фуксинофильные микобактерии на фоне клеток эпителиальной ткани, окрашенных в голубой цвет (рис. 3).

У другого серопозитивного пациента, не имеющего характерных для лепры клинических признаков, в поле зрения микроскопа на фоне назальной слизи выявлено большое количество базофильно окрашенных кокковых форм бактерий (рис. 4). У третьего серопозитивного пациента, также не имеющего клинических признаков, в мазке обнаружено скопление полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 5). У остальных пациентов, в т.ч. с клиническими признаками, специфи-

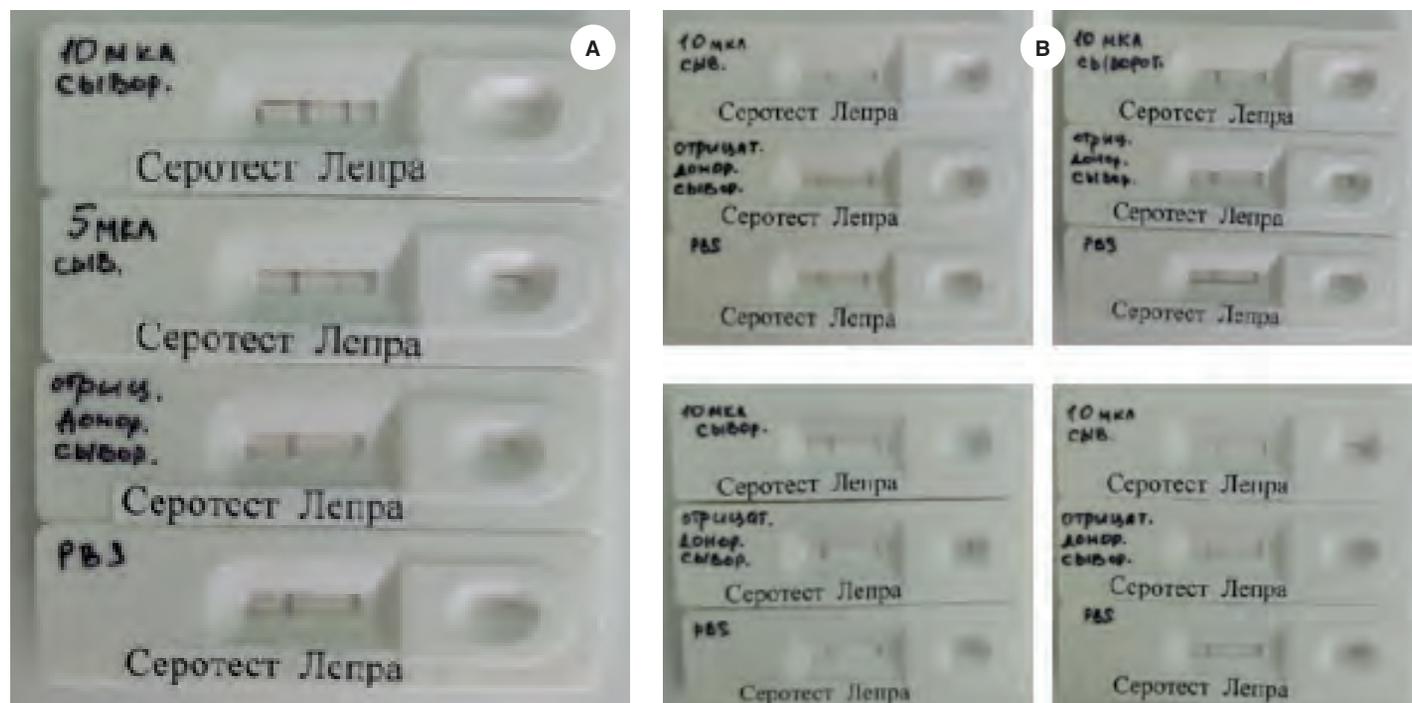


Рис. 1. ИХА с использованием «Серотест Лепра» (ФБУН ГНЦ ПМБ): а) с сывороткой пациента, имеющего характерные для лепры клинические признаки; в) с сыворотками пациентов, не имеющих характерных для лепры клинических признаков.

Fig. 1. Immunochromatographic analysis using Serotest Leprosy (State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology): a) with serum from a patient with clinical signs characteristic of leprosy; b) with serum from patients who do not have clinical signs characteristic of leprosy.

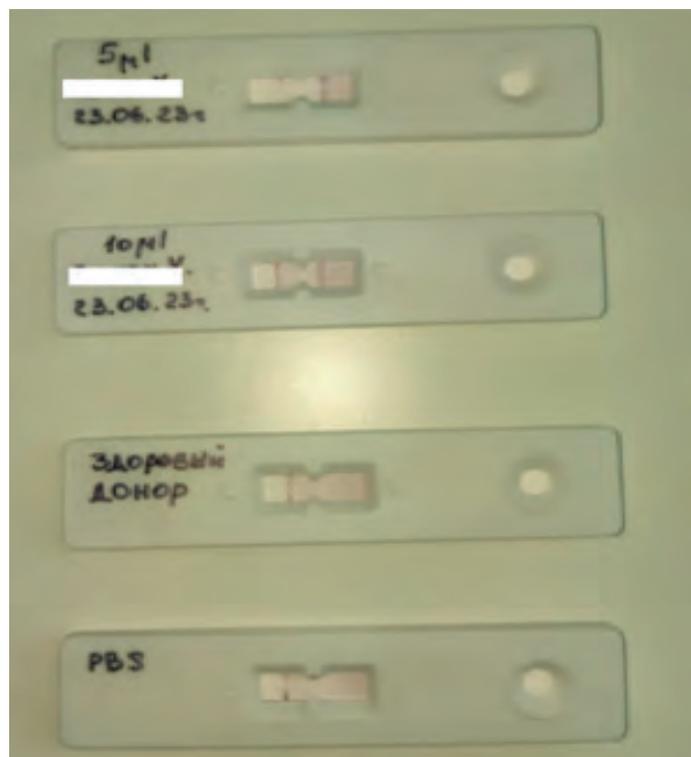


Рис. 2. ИХ-тест (Бразилия) с сывороткой пациента, имеющего характерные для лепры клинические признаки.
Fig. 2. Immunochromatographic tests (Brazil) with serum from a patient with clinical signs characteristic of leprosy.

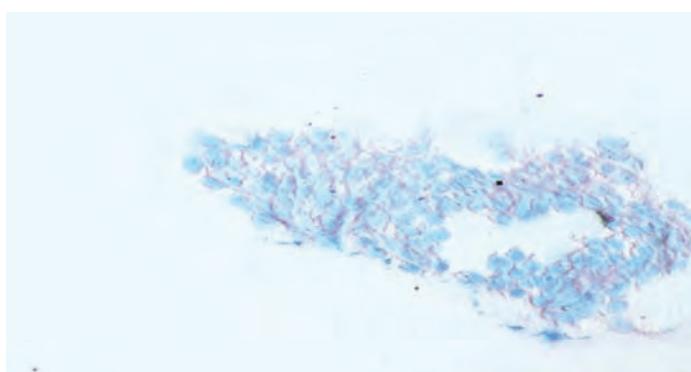


Рис. 3. Специфические фуксинофильные микобактерии на фоне клеток эпителиальной ткани.
Fig. 3. Specific fuchsinophilic mycobacteria against the background of epithelial tissue cells.

ческих фуксинофильных микобактерий в мазках не обнаружено.

Через 5 мес. лечения пациента с подтвержденным диагнозом «лепра (лепроматозная форма)» был осуществлен забор назальной слизи и скарификация пораженных участков кожи (мочки ушей, надбровные дуги, запястье, область локтевого сустава) с последующим нанесением мазков на стекла и окрашиванием их по Цилю-Нильсену. Микроскопию осуществляли на микроскопе «Микмед-6» при рабочем увеличении окуляров $\times 10$ и объектива $\times 100$ под иммерсией. По результатам микроскопического исследования во всех мазках были обнаружены специфические фуксинофильные микобактерии на фоне назальной слизи, клеток эпителиальной ткани и полиморфноядерных лейкоцитов, окрашенных в голубой цвет (рис. 6, 7).

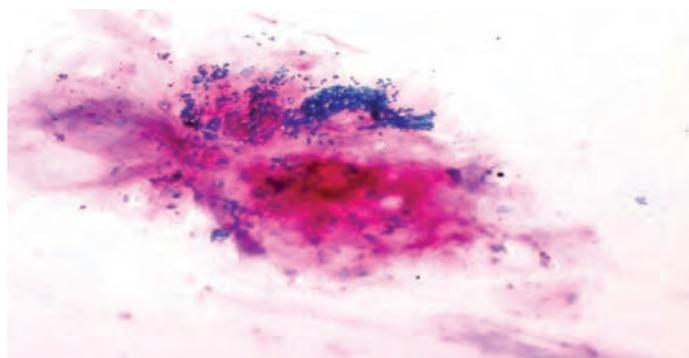


Рис. 4. Кокковые бактерии на фоне назальной слизи.
Fig. 4. Coccoid bacteria against the background of nasal mucus.

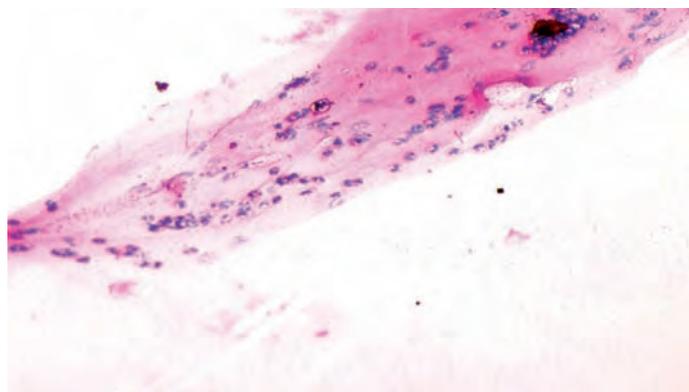


Рис. 5. Скопление полиморфноядерных лейкоцитов.
Fig. 5. Cluster of polymorphonuclear leukocytes.

Обсуждение

В соответствии с мировой статистикой, 26% подозрительных по лепре пациентов ожидают подтверждения диагноза в течение 8 мес. после первого обращения за первичной медико-санитарной помощью. Задержка или недостоверная диагностика происходит чаще в эндемичных районах с постоянным притоком мигрантов, где клиницисты редко сталкиваются со случаями лепры и нередко ставят ошибочные диагнозы на ранних стадиях заболевания лепрой. Ясно, что необходимы дополнительные исследования, чтобы понять взаимосвязь путей передачи между резервуаром инфекции и людьми с субклиническими формами инфекции с контактирующими лицами и окружающей средой. Вероятно, лица с субклиническими формами лепры также являются источниками инфекции, в связи с чем ранняя диагностика и своевременно начатое лечение препятствуют передаче возбудителя данного заболевания и развитию инвалидизирующих осложнений [15]. Титры антител против ФГЛ-1 прямо пропорционально коррелируют с прогрессированием лепроматозной формы лепры, неэффективностью лечения или рецидивом уже существующего заболевания. Однако у людей с адекватным иммунным статусом при высоких значениях титров антител при непосредственном контакте с источником заболевания лепра вряд ли разовьется, не считая семейных случаев лепры, при которых, по мнению множества авторов, имеется генетическая предрасположенность к заболеванию [3, 8]. Мета-анализ, проведенный исследователями из Бразилии, показывает, что среди здоровых людей, контактировавших с больными лепрой, риск развития болезни примерно в 3 раза выше у лиц с повышен-

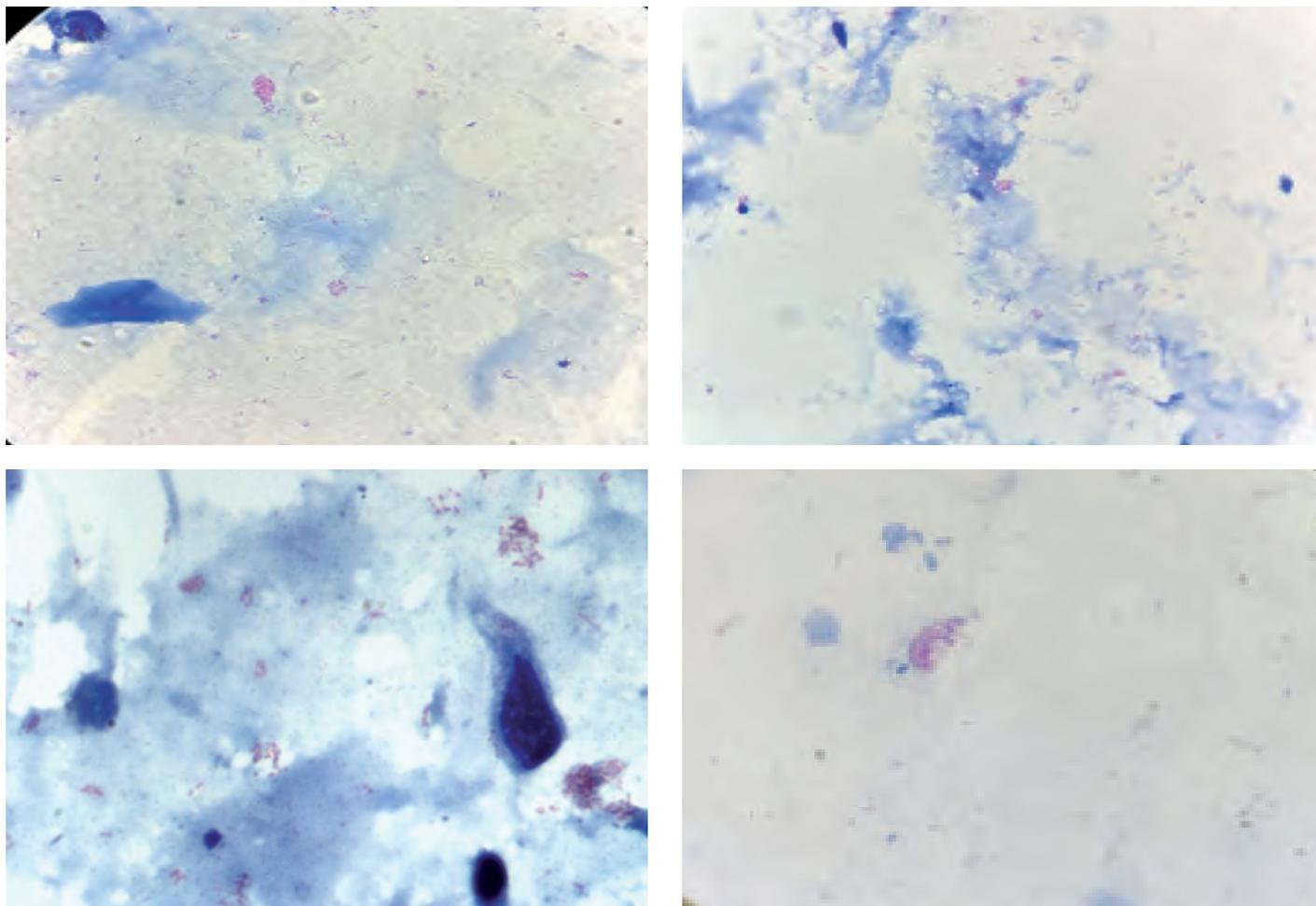


Рис. 6. Единичные полиморфные и множественные скопления (глобулы) фуксинофильных микобактерий.
Fig. 6. Single polymorphic and multiple clusters (globules) of fuchsinophilic mycobacteria.

ными титрами антител на ФГЛ-1-антиген [16, 17]. При туберкулоидной форме лепры тесты на определение гуморального иммунитета малоэффективны (30–40%) в связи с особенностями иммунопатогенеза данной формы заболевания, вследствие чего ее диагностика вызывает значительные трудности. По данным некоторых авторов, передача микобактерий происходит уже на этапе субклинических форм лепры [10, 18]. Исследования некоторых ученых зафиксировали повышенные титры антител IgG против микобактерии лепры у лиц, не имеющих клинических признаков заболевания и проживающих на территории эндемичных по лепре областей, что, по их мнению, связано с латентной иммунизацией населения. По наблюдениям американских исследователей, повышение специфических антител IgM нередко бывает предвестником заболевания клинической лепрой [11, 15], что особенно важно для прогнозирования заболеваемости населения в целом и является причиной более тщательного наблюдения за такими пациентами.

Заключение

Расширение торгово-экономических связей с дружественными странами, активные миграционные потоки, туризм, а также длительный инкубационный период, наследственная предрасположенность, сложный иммунопатогенез заболева-

ния, влияние социальных факторов, многообразные клинические проявления и тяжелые осложнения диктуют необходимость пристального внимания к диагностике лепры и обуславливают дальнейшее изучение и расширение возможностей ранней диагностики данного микобактериоза.

Проблема своевременной постановки диагноза по-прежнему остается актуальной, поскольку sporadическая заболеваемость, отсутствие готовности немедленного реагирования врачей с диагностической точки зрения, недостаточная информированность специалистов, нетипичные клинические проявления могут являться причиной длительного диагностического этапа и, соответственно, отсроченной специфической терапии, когда риск развития осложнений существенно возрастает [7, 9, 19].

Несмотря на sporadическую заболеваемость лепрой в России, выявленный клинический случай заболевания показывает необходимость бдительности врачей, пристального внимания и углубленного изучения анамнеза и грамотной диагностической дифференцировки клинически больных пациентов как в эндемичных, так и в неэндемичных регионах, поскольку своевременная диагностика данного микобактериоза способствует своевременному лечению и предотвращает развитие инвалидизирующих последствий [9].

Использованные нами иммунодиагностические тесты в качестве дополнительных диагностических инструментов в

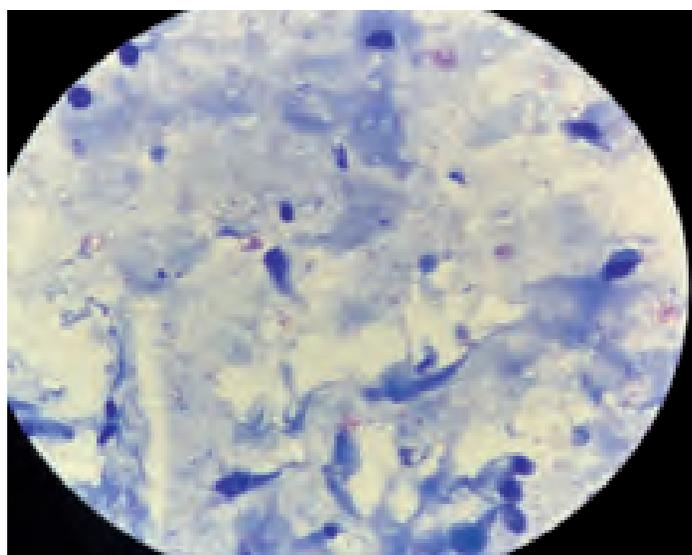
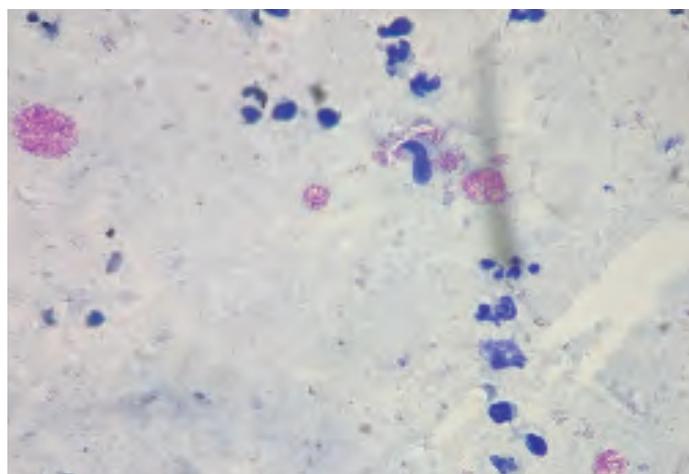
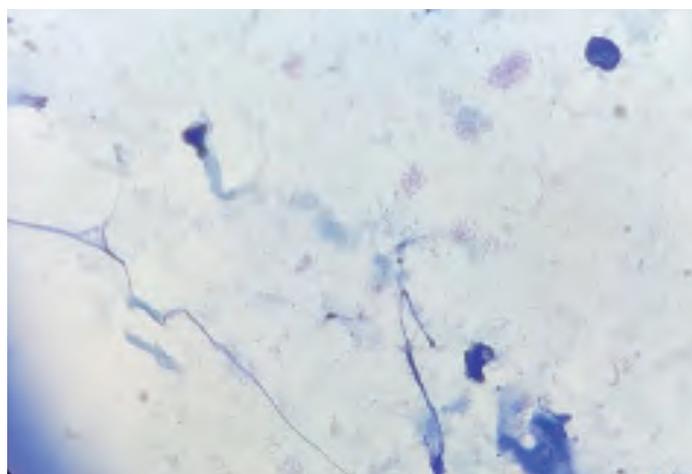
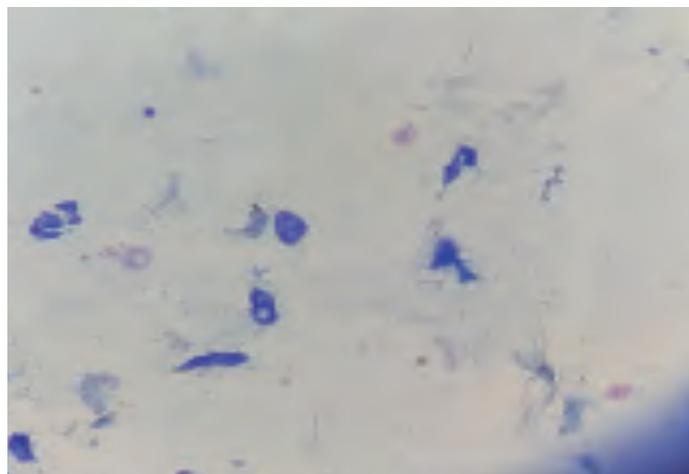
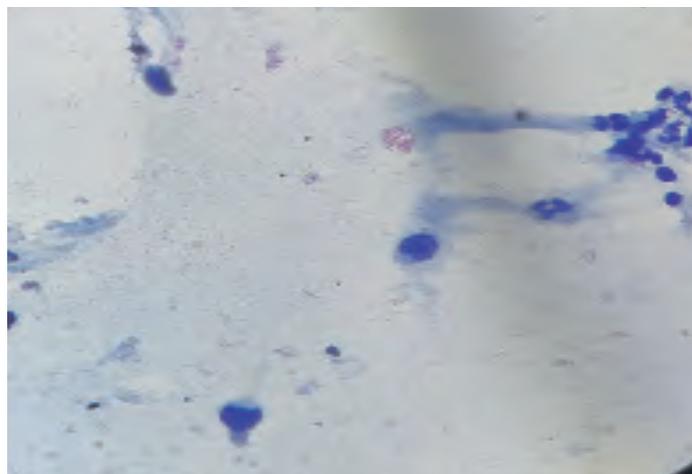


Рис. 7. Единичные полиморфные и множественные скопления (глобулы) фуксинофильных специфических микобактерий на фоне эпителиальных клеток и полиморфноядерных лейкоцитов, окрашенных в голубой цвет.

Fig. 7. Single polymorphic and multiple clusters (globules) of fuchsinophilic specific mycobacteria against the background of epithelial cells and polymorphonuclear leukocytes stained blue.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. World Health Organization. Leprosy. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy> (accessed 11 Jan 2022).
2. Белопасов ВВ. Типология и патогенез нейропатической боли при лепре. Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. 2018;2(9):41-45.
3. Кубанов АА, Абрамова ТВ, Мураховская ЕК, Ласачко ВА. Современный взгляд на лепру. Лечащий врач. 2018;5:48.
4. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. Clinics in dermatology. 2015;33(1):46-54. DOI: 10.1590/s0074-02762012000900014
5. Янчевская ЕЮ, Дуйко ВВ, Меснянкина ОА, Левичева ЮЮ. Случай лепроматозной лепры. Кубанский научный медицинский вестник. 2020;27(2):144-151. DOI: 10.25207/1608-6228-2020-27-2-144-151
6. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.

сочетании с микроскопией мазков подтверждают клинически установленный диагноз лепроматозной формы лепры и дают основание для рекомендаций врачам-инфекционистам по тщательному наблюдению за пациентами с выявленными повышенными титрами антител к *M. leprae*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках НИОКР 1.1.17.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.17.

7. Сароянц ЛВ, Арнаутова КШ, Абрамов ДД, Трофимов ДЮ. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(1):55-59. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59
8. Сароянц ЛВ, Болдырева МН, Гуськова ИА, Ющенко АА, Алексеев ЛП. Иммуногенетические маркеры предрасположенности к лепре у русских жителей Астраханского региона. Иммунология. 2005;26(5):263-267.
9. Hooij A, Geluk A. Immunodiagnosics for Leprosy. International Textbook of Leprosy. 2016. Open Access. DOI: 10.1489/itl
10. Kumar A, Parkash O, Girdhar BK. Analysis of antigens of *Mycobacterium leprae* by interaction to sera IgG, IgM, and IgA response to improve diagnosis of leprosy. Biomed Res Int. 2014;2014:283278. DOI: 10.1155/2014/283278
11. Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV, et al.; IDEAL Consortium. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. Clin Vaccine Immunol. 2011 Feb;18(2):260-7. DOI: 10.1128/0014-2931.00472-10
12. Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon MF, Kim HJ, Wheat WH, et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Dec;107 Suppl 1:79-89. DOI: 10.1590/s0074-02762012000900014
13. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, Гаврилова ЕМ. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991.
14. Кондаков НН, Мельникова ТМ, Чекрыжова ТВ, Мельникова МВ, Зинин АИ, Торгов ВИ, и др. Синтез дисахарида фенольного гликолипида (ФГЛ-1) из *Mycobacteria leprae* и его конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином. Известия Академии наук. Серия химическая. 2015;5:1142-1148. DOI: 10.1007/s11172-015-0991-6
15. Geluk A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. Expert Opin Med Diagn. 2013 May;7(3):265-74. DOI: 10.1517/17530059.2013.786039
16. Дегтярев ОВ, Ротанов СВ, Ибадулаев ЗЯ. Антитела класса М к полусинтетическому антигену *Mycobacteria leprae* – Dis-BSA у жителей эндемичного и неэндемичного регионов России. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2015;18(5):56-59.
17. Espinosa OA, Benevides Ferreira SM, Longhi Palacio FG, Cortela DDCB, Ignotti E. Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) in Detecting Antibodies against *Mycobacterium leprae* in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018 Nov 25;2018:9828023. DOI: 10.1155/2018/9828023
18. Bazan-Furini R, Motta AC, Simão JC, Tarquinio DC, Marques W Jr, Barbosa MH, Foss NT. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106(5):536-40. DOI: 10.1590/s0074-02762011000500003
19. Дегтярев ОВ, Дячина МН, Дуйко ВВ, Паршин МП. Прогностическое значение сероэпидемиологического обследования при лепре. Туберкулез и болезни легких. 1995;2:35-37.
5. Yanchevskaya EYu, Duiko VV, Mesnyankina OA, Levicheva YuYu. A case of lepromatous leprosy. Kuban Scientific Medical Bulletin. 2020;27(2):144-151. DOI: 10.25207/1608-6228-2020-27-2-144-151 (In Russian).
6. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.
7. Saroyants LV, Arnaudova KSh, Abramov DD, Trofimov DYu. The development of laboratory diagnostic of leprosy using polymerase chain reaction. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2018;63(1):55-59. (In Russian). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59
8. Saroyants LV, Boldyreva MN, Gus'kova IA, Yuschenko AA, Alexeev LP. Immunogenetic markers of predisposition to leprosy among russian citizens in Astrakhan region. Immunologiya. 2005;26(5):263-267. (In Russian).
9. Hooij A, Geluk A. Immunodiagnosics for Leprosy. International Textbook of Leprosy. 2016. Open Access. DOI: 10.1489/itl
10. Kumar A, Parkash O, Girdhar BK. Analysis of antigens of *Mycobacterium leprae* by interaction to sera IgG, IgM, and IgA response to improve diagnosis of leprosy. Biomed Res Int. 2014;2014:283278. DOI: 10.1155/2014/283278
11. Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV, et al.; IDEAL Consortium. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. Clin Vaccine Immunol. 2011 Feb;18(2):260-7. DOI: 10.1128/0014-2931.00472-10
12. Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon MF, Kim HJ, Wheat WH, et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Dec;107 Suppl 1:79-89. DOI: 10.1590/s0074-02762012000900014
13. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, Гаврилова ЕМ. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. (In Russian).
14. Kondakov NN, Melnikova TM, Chekryzhova TV, Melnikova MV, Zinin AI, Torgov VI, et al. Synthesis of a disaccharide of phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* (PGL-I) and its conjugates with bovine serum albumin. Russ Chem Bull. 2015;5:1142-1148. DOI: 10.1007/s11172-015-0991-6 (In Russian).
15. Geluk A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. Expert Opin Med Diagn. 2013 May;7(3):265-74. DOI: 10.1517/17530059.2013.786039
16. Degtyarev OV, Rotanov SV, Ibadulaev ZYa. IgM antibodies to *Mycobacterium leprae* Dis-BSA semisynthetic antigen in residents of an endemic and nonendemic regions of Russia. Russian Journal of Skin and Venereal Diseases. 2015;18(5):56-59. (In Russian).
17. Espinosa OA, Benevides Ferreira SM, Longhi Palacio FG, Cortela DDCB, Ignotti E. Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) in Detecting Antibodies against *Mycobacterium leprae* in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018 Nov 25;2018:9828023. DOI: 10.1155/2018/9828023
18. Bazan-Furini R, Motta AC, Simão JC, Tarquinio DC, Marques W Jr, Barbosa MH, Foss NT. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106(5):536-40. DOI: 10.1590/s0074-02762011000500003
19. Degtyarev OV, Dyachina MN, Duiko VV, Parshin MP. Prognosticheskoe znachenie seroepidemiologicheskogo obsledovaniya pri lepre. Tuberculosis and Lung Diseases. 1995;2:35-37. (In Russian).

References

1. World Health Organization. Leprosy. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy> (accessed 11 Jan 2022).
2. Belopasov VV. Tipologiya i patogenez neiropaticheskoi boli pri lepre. Russkii meditsinskii zhurnal. Meditsinskoe obozrenie. 2018;2(9):41-45. (In Russian).
3. Kubanov AA, Abramova TV, Murakhovskaya EK, Lasachko VA. Sovremennyy vzglyad na lepru. The Lechaschi vrach Journal. 2018;5:48. (In Russian).
4. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. Clinics in dermatology. 2015;33(1):46-54. DOI: 10.1590/s0074-02762012000900014

Информация о соавторах:

Баранова Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

Information about co-authors:

Evgenia V. Baranova, PhD, MD, Leading Researcher of the Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elena A. Ganina, Researcher of the Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anton G. Shevyakov, Researcher of the department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Michail V. Khramov, PhD, MD, Deputy Director for Quality and Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD, MD, Chief Researcher of the immunobiochemistry of pathogens microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, MD, PhD, DSc, professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Генетика холеры – ключ к ее профилактике

Эксперты использовали передовой компьютерный подход для обнаружения генетических факторов, которые делают бактерии, вызывающие холеру, такими опасными, что может стать ключом к предотвращению этой смертельной болезни.

Инновационное исследование объединяет машинное обучение, геномику, метаболическое моделирование на уровне генома (GSMM) и 3D-структурный анализ, чтобы раскрыть генетические секреты *Vibrio cholerae* – бактерии, вызывающей холеру.

Холера – смертельное диарейное заболевание, которое продолжает угрожать миллионам людей по всему миру: ежегодно регистрируется до 4 миллионов случаев заболевания и до 143 000 смертей. Только в Бангладеш, где холера является постоянной опасностью, риску подвержены 66 миллионов человек, ежегодно регистрируется более 100 000 случаев заболевания и 4500 смертей.

Vibrio cholerae эволюционирует таким образом, что делает болезнь более серьезной и труднее поддающейся контролю, но до сих пор ученые не могли точно определить генетические факторы, обуславливающие эти изменения.

Еще меньше знаний о геномных признаках, ответственных за тяжесть холеры, возникающих в результате этих линий. Примерно у 1 из 5 человек, больных холерой, будет тяжелое состояние из-за сочетания симптомов (в первую очередь диарея, рвота и обезвоживание).

Британско-бангладешская исследовательская группа проанализировала бактериальные образцы от пациентов с холерой в шести регионах Бангладеш, собранные в период с 2015 по 2021 год. Они выявили набор уникальных генов и мутаций в самом последнем и доминирующем штамме *Vibrio cholerae*, ответственном за разрушительную вспышку 2022 года.

Определив ключевые генетические факторы, которые управляют как передачей, так и тяжестью холеры, был сделан значительный шаг к разработке более эффективных методов лечения и целевых вмешательств. Это может спасти тысячи жизней не только в Бангладеш, но и во всем мире.

Результаты исследования также показали, что некоторые из этих болезнетворных черт пересекаются с теми, которые помогают бактериям легче распространяться. Результаты показывают, как эти генетические факторы позволяют *Vibrio cholerae* выживать в кишечнике человека, делая его более устойчивым к стрессу окружающей среды и более эффективным в вызывании заболеваний. Это исследование подчеркивает сложные взаимодействия между генетическим составом бактерий и их способностью вызывать тяжелые заболевания.

Maciel-Guerra A, Babaarslan K, Baker M, Rahman A, Hossain M, Sadique A, et al.
Core and accessory genomic traits of Vibrio cholerae O1 drive lineage transmission and disease severity.
Nat Commun. 2024 Sep 23;15(1):8231. DOI: 10.1038/s41467-024-52238-0

Разработка и оценка эффективности отечественного селективного бульона Жиолитти–Кантони для накопления и идентификации *Staphylococcus aureus*

О.В.Полосенко, М.В.Храмов, А.Ю.Сёмина

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

Роль стафилококков в этиологии различных заболеваний неуклонно растёт. Пищевая стафилококковая инфекция, вызванная *Staphylococcus aureus*, является одной из наиболее распространенных причин пищевых отравлений в мире. Для мониторинга состояния продуктов питания на содержание стафилококков с целью профилактики пищевых отравлений и токсикоинфекций основным является метод культурального исследования, а в числе приоритетных направлений – разработка и внедрение в практику современных питательных сред для выявления и ускоренного выделения патогена.

Целью работы явилась разработка отечественной питательной среды «Бульон Жиолитти–Кантони» для накопления и идентификации *S. aureus*. Проведена специфическая оценка биологических свойств питательной среды на широком наборе тест-штаммов. Разработана среда, состав которой в совокупности с условиями культивирования определяет множественность выполняемых ею функций: редукция теллурита калия в металлический теллур облегчает идентификацию стафилококков уже на этапе первичного исследования; хлорид лития, теллурит калия и анаэробные условия способствуют угнетению роста сопутствующих бактерий. С целью получения сухой питательной основы бульона Жиолитти–Кантони отработана технология высушивания панкреатического гидролизата рыбной муки с твином. Исследование показало корректность выбора белковой основы, позволяющей получить сухую среду с улучшенными ростовыми и селективными свойствами.

Ключевые слова: стафилококки, *Staphylococcus aureus*, бульон Жиолитти–Кантони, агар Байрд–Паркера, твин, эффективность

Для цитирования: Полосенко О.В., Храмов М.В., Сёмина А.Ю. Разработка и оценка эффективности отечественного селективного бульона Жиолитти–Кантони для накопления и идентификации *Staphylococcus aureus*. Бактериология. 2024; 9(3): 46–51. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-46-51

Development and evaluation of the effectiveness of the domestic selective Giolitti–Cantoni broth for the accumulation and identification of *Staphylococcus aureus*

O.V.Polosenko, M.V.Khramov, A.Yu.Semina

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

The role of staphylococci in the etiology of various diseases is steadily growing. Staphylococcal foodborne infection caused by *Staphylococcus aureus* is one of the most common causes of food poisoning worldwide.

To control food stuffs for staphylococci to prevent food poisoning and toxic infections there is the main method of culture research, and among areas of priority is the development and implementation of modern nutrient media allowing the detection and express isolation of the pathogen.

The objective of the research was to develop a nutrient medium “Giolitti–Cantoni Broth” for the accumulation and identification of *S. aureus*. Biological properties of the nutrient medium were specifically assessed using a wide range of test strains from the

Для корреспонденции:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-21-70
E-mail: polosenko@obolensk.org

Статья поступила 15.10.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Olga V. Polosenko, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiological and Physic-Chemical Methods Of Analysis Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 31-21-70
E-mail: polosenko@obolensk.org

The article was received 15.10.2024, accepted for publication 30.09.2024

State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures (SCPM-Obolensk). A medium has been developed, whose composition along with culture conditions determines the multiplicity of its functions. The reduction of potassium tellurite to metallic tellurium facilitates the identification of staphylococci as early as at the stage of initial research. Lithium chloride, potassium tellurite, and anaerobic conditions contribute to the inhibition of the growth of concomitant bacteria. To produce a dry nutritional base for Giolitti–Cantoni broth the technology of drying fish meal pancreatic hydrolysate in the presence of twin has been developed. The research proved the right choice of the protein base allowing the production of the dry medium with improved growth and selective properties.

Key words: *staphylococci, Staphylococcus aureus, Giolitti–Cantoni broth, Baird-Parker agar, twin, effectiveness*

For citation: Polosenko O.V., Khramov M.V., Semina A.Yu. Development and evaluation of the effectiveness of the domestic selective Giolitti–Cantoni broth for the accumulation and identification of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriology*. 2024; 9(3): 46–51. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-46-51

Широкое распространение заболеваний стафилококковой инфекцией связано в первую очередь с интенсивностью циркуляции стафилококков, значительной устойчивостью их во внешней среде и естественным отбором высоковирулентных, полирезистентных к антибактериальным препаратам штаммов. Устойчивые штаммы бактерий рода *Staphylococcus* являются одной из наиболее актуальных проблем медицины на протяжении длительного времени. Это связано с тем, что стафилококки имеют ряд патогенных факторов и вырабатывают множество метаболитов с выраженными токсическими свойствами [1].

Существует более 23 токсинов стафилококковых суперантигенов, обладающих способностью инициировать массивную неспецифическую активацию Т-клеток, приводящую к выбросу провоспалительных цитокинов (например, интерлейкина-2, интерферона- γ и фактора некроза опухоли и др.), тем самым вызывая появление высокой температуры, сыпи, рвоты, диареи, гипотонии и других различных симптомов, которые часто могут приводить к развитию полиорганной недостаточности [2].

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) является широко распространенным микроорганизмом, способным вызывать разные по форме и тяжести инфекции. По сравнению с другими представителями этого рода золотистый стафилококк обладает более широким набором факторов вирулентности [3, 4]. Штаммы *S. aureus* продуцируют суперантигены, действие которых приводит к развитию различных интоксикаций, таких как пищевая токсикоинфекция и синдром токсического шока [5–7].

Ответственными за клиническую картину пищевой инфекции являются стафилококковые энтеротоксины, представляющие собой экзотоксины с сильным действием на желудочно-кишечный тракт. Абсолютное большинство случаев пищевой токсикоинфекции связано с продукцией основных энтеротоксинов: А, В, С, D и Е. Энтеротоксины обладают свойствами суперантигенов и способны вызывать неспецифическую пролиферацию Т-лимфоцитов [5, 6].

Основными источниками обсеменения *S. aureus* пищевых продуктов являются люди и животные с гнойно-воспалительными процессами (абсцессы, фурункулы, гнойные раны и др.), а также носители этих микроорганизмов. Контаминированные пищевые продукты создают возможность возникновения различных заболеваний при употреблении их отдельными лицами и целыми коллективами [1, 8, 9].

Для профилактики пищевых отравлений и токсикоинфекций, вызываемых стафилококками, необходимы исследова-

ния пищевых продуктов на соответствие требованиям Госстандартов [10–12].

Применение культурального метода обеспечивает возможность выделения возбудителя, получения чистой культуры, изучения его морфологических и физиологических особенностей. Выделение чистой культуры стафилококка на основных средах осуществляется с учетом его культуральных особенностей галофильности (хорошее развитие в присутствии избыточного содержания поваренной соли при одновременном угнетении прочей микрофлоры). Тем не менее высокая концентрация хлористого натрия все же недостаточна для подавления некоторых сопутствующих микроорганизмов [13]. В настоящее время востребованы питательные среды, обладающие не только более выраженными селективными свойствами, но и позволяющие идентифицировать стафилококки на этапе первичного посева.

В отечественной нормативно-методической базе существует ряд методических документов, регламентирующих определение стафилококков в продуктах питания. Существует некоторое отличие методик, изложенных в отечественных и международных документах, заключающееся в питательных средах, которые регламентированы для определения соответствующего показателя. Так, предположительное присутствие коагулазоположительных стафилококков в бульоне Жиолитти–Кантони определяют по редукции теллуриата калия, на глюкозном или солевом бульоне – по помутнению среды [12].

Подтверждение принадлежности типичных и/или атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам проводят по изучению отношения выявленных микроорганизмов к окраске по Граму, определению присутствия у них каталазы и коагулазы, наличию лецитиназы на питательных средах с внесенной желточной эмульсией (агар Байрд-Паркера, маннит-солевой агар с желтком и др.) [14, 15].

Создатели основы бульона Жиолитти–Кантони рекомендовали использовать эту среду для выделения *S. aureus* при малой их численности в пищевых продуктах [16]. Зарубежные производители выпускают бульон Жиолитти–Кантони (Giolitti Cantoni Broth Base) для выделения *S. aureus* из пищевых продуктов, кормов для животных. В качестве белковой основы в средах используются пептон из казеина и говяжий экстракт. Российские стандарты для накопления коагулазоположительных стафилококков также регламентируют использование бульона Жиолитти–Кантони, обладающего высокими селективными свойствами для первичного выделения *S. aureus*, поэтому в настоящее время актуально его производство.

В связи с вышеизложенным целью исследования явилась разработка отечественного селективного бульона Жиолитти–Кантони для накопления и идентификации *S. aureus* и оценка его эффективности.

Материалы и методы исследования

Питательные среды. В исследовании использовали среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ: среда для селективного обогащения *S. aureus* – бульон Жиолитти–Кантони; солевой бульон для выделения стафилококков сухой (ТУ 20.59.52-293-78095326-2018), основа агара Байрд–Паркера сухая (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7198). ГРМ–агар (регистрационное удостоверение № ФСР 2011/11415) использовали в качестве среды для контроля посевной дозы используемых тест–штаммов. Основу бульона Жиолитти–Кантони (Gioliotti Cantoni Broth Base производства HiMedia) с калия теллуритом 3,5% раствор FD047 использовали в качестве среды сравнения. В бульон Жиолитти–Кантони и агар Байрд–Паркера вносили селективную добавку – калия теллурит 2% раствор (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) из расчета 2,5 мл на 1 л среды.

Эмульсию яичного желтка (для основы агара Байрд–Паркера) готовили по общепринятой методике согласно ГОСТ 31746-2012 [12].

Для создания анаэробных условий использовали стерильное вазелиновое масло (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»).

Посевы инкубировали 24–48 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Специфическую активность питательных сред оценивали в соответствии с МУК 4.2.2316–08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [17]. Использовали рабочие разведения 10^{-6} – для тест–штаммов *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46, *S. epidermidis* ATCC 14990. Для оценки ингибирующих свойств сред использовали культуры тест–штаммов *Escherichia coli* 3912/41 (O55:K59), *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775), *Bacillus cereus* ATCC 10702 (NCTC 8035), *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 из разведений 10^{-5} .

Тест–штаммы микроорганизмов получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ–Оболенск».

Эффективность среды – выход микробных клеток с 1 мл питательной среды и прирост числа микроорганизмов относительно засеянного (показатель эффективности) – определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [17].

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе конструирования бульона Жиолитти–Кантони в качестве источника азотистого питания были исследованы разные белковые основы отечественных и зарубежных производителей: панкреатический гидролизат казеина (ПГК), панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ), ферментативный пептон, мясной пептон. Использовали следующие комбинации белковых основ: ПГК (9,0 г/л), ПГК (4,5 г/л) с мясным экстрактом (4,5 г/л), ПГК с различными

пептонами в соотношениях 1:1, ПГРМ (9,0 г/л), ПГРМ с различными пептонами в соотношениях 1:1. Концентрации остальных компонентов (дрожжевой экстракт – 5,0; маннит – 20,0; натрий хлористый – 5,0; литий хлористый – 5,0; глицин – 1,2; натрия пируват – 3,0) соответствовали составу, представленному в ГОСТ 31746.

После посева всех тест–штаммов на поверхность каждой пробирки со средой осторожно настилали слой стерильного вазелинового масла в количестве 0,5 мл.

При биологическом контроле на предварительных составах экспериментальных вариантов бульонов Жиолитти–Кантони рост стафилококков определяли по диффузному помутнению и почернению.

Характер роста стафилококков на бульонах Жиолитти–Кантони с использованием различных питательных основ представлен в табл. 1.

На всех вариантах с использованием различных белковых основ полностью подавлен рост *E. coli* 3912/41 (O55:K59), *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* 27/99, *M. luteus* ATCC 10240, *E. faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775), *B. cereus* ATCC 10702 (NCTC 8035) и частично (придонный рост) *P. vulgaris* НХ 19 222 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-5} через 24–48 ч инкубации при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Отсутствие/наличие роста подтверждалось высевом 0,1 мл культуральной жидкости на ГРМ–агар.

По ростовым свойствам тест–штаммов *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46 предварительный положительный результат экспериментальных образцов бульона Жиолитти–Кантони был получен при использовании в составе среды комбинации ПГРМ с мясным пептоном.

На втором этапе разработки этой среды целесообразно было создание сухой основы среды, которая бы отвечала предъявляемым требованиям к средам данного назначения (хорошие ростовые свойства представителей *S. aureus* при максимальном подавлении нежелательной микрофлоры, предположительно присутствующей в образцах), поэтому дополнительно были изучены основы ПГРМ с твином (1,0 мл/л).

В процессе изучения применяли полный факторный эксперимент (ПФЭ) для выбора оптимальной комбинации белковых основ. Каждая матрица ПФЭ включала от двух до трех факторов. Применением ПФЭ был доказан оптимальный выбор соотношения белковых компонентов в бульоне Жиолитти–Кантони для получения более высокой эффективности.

Твин-80, выступающий в роли нейтрализатора фенолов, гексахлорофена и формалина и необходимый в среде как стимулятор роста стафилококков, промышленностью производится в жидкой форме в виде маслянистой, достаточно вязкой жидкости. Поэтому в ходе работ была изучена возможность получения сухой основы: ПГРМ высушенного с твином – модифицированного (ПГРМ–ТВмод) с целью создания стандартной сухой питательной среды. В результате проведенных исследований скорректировано содержание в основе ПГРМ и твина в соотношении 8:1. С отработкой технологии высушивания ПГРМ с твином была решена задача получения сухой основы – панкреатического гидролизата рыбной муки с твином модифицированного сухого (ПГРМ–ТВмод) для бульона Жиолитти–Кантони.

Таблица 1. Рост тест-штаммов *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46, *S. epidermidis* ATCC 14990 на бульонах Жиолитти–Кантони с использованием различных питательных основ
 Table 1. Growth of test strains *S. aureus* «Viotko», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46, *S. epidermidis* ATCC 14990 in Giolitti–Cantoni broths using different nutrient bases

Основа питательной среды / Basis of the nutrient medium	<i>S. aureus</i> «Виотко»	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	<i>S. aureus</i> Wood-46	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	
					Разведение 10 ⁶ / Dilution 10 ⁶
ПГК / <i>Pancreatic Casein Hydrolysate</i> (PCH)	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	
ПГК с мясным экстрактом (1:1) / <i>PCH with meat Extract</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	
ПГК с мясным пептоном (1:1) / <i>PCH with meat peptone (1:1)</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	
ПГРМ / <i>Pancreatic Hydrolysate of fish meal</i> (PCFM)	Слабый рост, слабое почернение осадка / <i>Poor growth blackening of sediment</i>	Слабый рост, слабое почернение осадка / <i>Poor growth blackening of sediment</i>	Слабый рост, слабое почернение осадка / <i>Poor growth blackening of sediment</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	
ПГРМ с мясным пептоном (1:1) / <i>PCFM with meat peptone (1:1)</i>	Диффузный рост, помутнение среды, черный осадок / <i>Diffuse growth, turbidity, black precipitate</i>	Диффузный рост, помутнение среды, черный осадок / <i>Diffuse growth, turbidity, black precipitate</i>	Диффузный рост, помутнение среды, черный осадок / <i>Diffuse growth, turbidity, black precipitate</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	
Мясной пептон / <i>Meat peptone</i>	Диффузный рост, помутнение, черный осадок / <i>Diffuse growth, turbidity, black precipitate</i>	Диффузный рост, помутнение, черный осадок / <i>Diffuse growth, turbidity, black precipitate</i>	Диффузный рост, помутнение, черный осадок / <i>Diffuse growth, turbidity, black precipitate</i>	Слабый рост, незначительное почернение осадка / <i>Poor growth slight blackening of sediment</i>	
Ферментативный пептон / <i>Enzymatic peptone</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	Рост отсутствует / <i>No growth</i>	
Контроль посевной дозы / <i>Seed dose control</i>	Количество колоний (среднее значение) / <i>Number of colonies (average)</i>				
ГРМ-агар / <i>Hydrolyzed fishmeal agar</i>	71, типичная морфология / <i>71 typical morphology</i>	64, типичная морфология / <i>64 typical morphology</i>	67, типичная морфология / <i>67 typical morphology</i>	73, типичная морфология / <i>73 typical morphology</i>	

По результатам экспериментов составлена пропись бульона Жиолитти–Кантони в г/л:

ПГРМ-ТВмод	9,0
Пептон мясной	3,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Д-маннит	20,0
Натрий хлористый	5,0
Литий хлористый	5,0
Глицин	1,2
Натрия пируват	3,0
2%-й р-р теллурита калия	2,5 мл
рН = 6,8–7,2.	

На следующем этапе исследований был проведен сравнительный анализ биологических показателей качества с использованием минимального набора тест-штаммов, наиболее ярко характеризующих назначение разработанного бульона Жиолитти–Кантони и коммерческого аналога Giolitti Cantoni Broth Base (HiMedia).

После инкубации посевов в течение 24–48 ч в бульоне Giolitti Cantoni Broth рост всех тест-штаммов *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46, *S. epidermidis* ATCC 14990 визуально обнаруживался во всех засеянных пробирках. Кроме того, почернение бульона наблюдалось и в пробирках с посевами тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 3912/41 (O55:K59) и *M. luteus* ATCC 10240, что затрудняло интерпретацию результатов.

Разработанный бульон Жиолитти–Кантони обеспечивал хороший рост тест-штаммов *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46 уже через 24 ч инкубации посевов в виде почернения среды, тест-штамма *S. epidermidis* ATCC 14990 в виде незначительного черного преципитата на дне пробирки – через 48 ч.

Бульоны Жиолитти–Кантони и Giolitti Cantoni Broth подавляли рост тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 3912/41 (O55:K59) и *M. luteus* ATCC 10240 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁻⁵ через 48 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С, что было подтверждено последующим высевом по 0,1 мл культуральной жидкости на ГРМ-агар.

Высокая степень ингибиции сопутствующих микроорганизмов в бульоне Жиолитти–Кантони обусловлена наличием хлорида лития и теллурита калия, а наличие в среде маннита и глицина компенсирует действие ингибиторов на стафилококки. За счет внесения стерильного вазелинового масла в среду создается анаэробноз, в следствие чего тормозится рост *Micrococcus* spp.

Результаты биологического контроля бульонов Жиолитти–Кантони с добавлением теллурита калия считали отрицательным для золотистого стафилококка, если не наблюдалось почернения среды. Почернение бульона по всему объему среды указывало на присутствие *S. aureus*. Для подтверждения присутствия патогенных стафилококков из по-

Таблица 2. Сравнительная характеристика показателей эффективности селективных бульонов для накопления стафилококков
 Table 2. Comparative characteristics of the effectiveness indicators of selective broths for the accumulation of staphylococci

Наименование тест-штаммов / Name of test strains	Время культивирования, ч / Cultivation time, h	Giolitti Cantoni Broth Base (Hi Media)	Бульон Жиолитти–Кантони	Солевой бульон / Salt broth	Коэффициент эффективности / Efficiency factor		
		1-й вариант / 1 option	2-й вариант / 2 option	3-й вариант / 3 option	1-й вариант / 1 option	2-й вариант / 2 option	3-й вариант / 3 option
<i>S. aureus</i> «Виотко»	0	5	3	4	16	19	30
	6	80	58	120			
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	0	12	7	13	15	29	38
	6	180	200	494			
<i>S. aureus</i> Wood-46	0	2	1	2	8	9	20
	6	16	9	40			

Средний разброс значений коэффициента эффективности составляет 10% (в пределах погрешностей опыта). / The average spread of the efficiency coefficient values is 10% (within the experimental error).

Показатели эффективности селективных питательных сред для накопления стафилококков /
 Indicators of the effectiveness of selective nutrient media for the accumulation of staphylococci

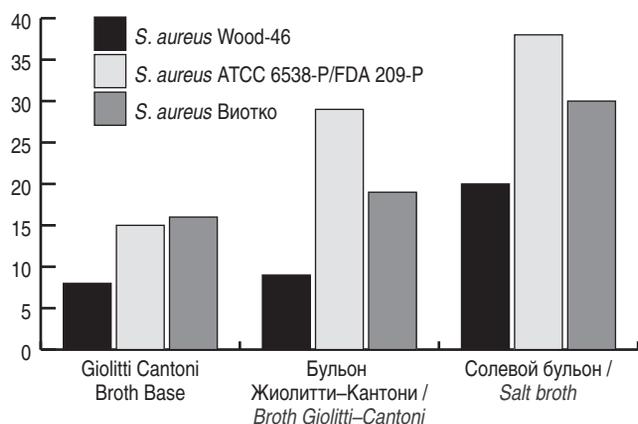


Рисунок. Сравнительная характеристика показателей эффективности селективных бульонов для накопления стафилококков.

Figure. Comparative characteristics of the effectiveness of selective broths for the accumulation of staphylococci.

черневших пробирок суспензию наносили штрихами на среду для выделения стафилококков – агар Байрд–Паркера; посеы инкубировали при 37°C в течение 24–48 ч. Результат считали положительным при наличии черных колоний, окруженных прозрачной зоной протеолиза.

При выявлении коагулазоположительных стафилококков в пищевых продуктах в качестве накопительных питательных сред действующие нормативные документы регламентируют использование глюкозного бульона, солевого бульона или бульона Жиолитти–Кантони. В ходе выполнения работ при разработке бульона Жиолитти–Кантони в сравнении с средой Giolitti Cantoni Broth (HiMedia) и солевым бульоном были определены коэффициенты эффективности в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Для получения данных по определению показателя эффективности бульона из засеянных пробирок каждого тест-штамма, содержащих 100 м.кл./мл (нулевой посев), производили высев по 0,1 мл микробной взвеси на чашки Петри с

ГРМ-агаром. После инкубации засеянных бульонов через 6 ч также высевали на ГРМ-агар (по 0,1 мл на чашку). Через 18–20 ч инкубации посевов на ГРМ-агаре при температуре 37 ± 1°C производили подсчет сформировавшихся колоний. Показатель эффективности рассчитывали по отношению числа колоний после инкубации культуры в накопительной среде к числу колоний при нулевом посеве.

Сравнительная характеристика показателей эффективности различных бульонов для накопления стафилококков представлена на рисунке и в табл. 2.

Результаты коэффициентов эффективности накопления стафилококков в разработанном бульоне Жиолитти–Кантони превосходили коммерческую в 1,2–1,9 раза, но уступали солевому бульону.

Бульоны Жиолитти–Кантони в данном исследовании имели преимущество, так как обеспечивали рост тест-штаммов *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P и *S. aureus* Wood-46 с почернением среды. Изменение цвета бульона Жиолитти–Кантони в предварительном фенотипическом тесте позволяет выделять и дифференцировать патогенные стафилококки.

Выводы

Таким образом, разработанный отечественный селективный бульон Жиолитти–Кантони с использованием модифицированной основы ПГРМ высушенной с твином, обладающий высокой чувствительностью в отношении коагулазоположительных стафилококков, позволит ускорить идентификацию стафилококков уже на этапе первичного посева.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The research was supported by the Rospotrebnadzor industry program.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Бородина ЕС, Богданова ОЮ. Микробиологические исследования пищевых продуктов на наличие бактерий рода *Staphylococcus*. Успехи современного естествознания. 2011;8:24.
2. Шамсутдинов АФ, Тюрин ЮА. Белковые токсины *Staphylococcus aureus*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014;2:113-120.
3. Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 2012 Sep;61(Pt 9):1179-1193. DOI: 10.1099/jmm.0.043513-0
4. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1;33(Database issue):D325-8. DOI: 10.1093/nar/gki008
5. Ющук НД, Мартынов ЮВ, Кухтевич ЕВ, Кулагин МГ. Пищевые токсикоинфекции. Пищевые отравления. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017.
6. Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. Chem Immunol. 1992;55:1-35.
7. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr Med Chem. 2009;16(30):4003-19. DOI: 10.2174/092986709789352321
8. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int. 2014;2014:827965. DOI: 10.1155/2014/827965
9. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar 31;2(1):63-76.
10. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарные правила и нормативы. СанПиН 2.3.2.1078–01. Введ. 2002-07-01. М., 2002.
11. ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*». М.: Стандартинформ, 2016.
12. ГОСТ 31746-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. Межгосударственный стандарт. Введ. 2013-07-01. М.: Стандартинформ, 2013.
13. Полосенко ОВ, Шепелин АП, Ажержачева НИ, Абаев ИВ. Клинические испытания новых питательных сред для выделения стафилококков. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(2):115-121. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121
14. Боталов НС, Чепкасова НИ, Некрасова ЮЭ. Методы выявления и определения количества *Staphylococcus aureus* в пищевых продуктах. Международный студенческий научный вестник. 2018;5:37.
15. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография. Под ред. Поповой АЮ, Дятлова ИА. М.: Династия, 2020; 96-102.
16. Giolitti G, Cantoni C. A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. J Appl Bacteriol. 1966 Aug;29(2):395-8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1966.tb03488.x
17. МУК 4.2.2316–08 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. Введ. 2008-01-18. М.: Федеральный центр гигиены и эпиднадзора Роспотребнадзора, 2008.

References

1. Borodina ES, Bogdanova OYu. Microbiological studies of food products for the presence of bacteria of the genus *Staphylococcus*. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2011;8:24. (In Russian).
2. Shamsutdinov AF, Tyurin YuA. Protein toxins of *Staphylococcus aureus*. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2014;2:113-120. (In Russian).

3. Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 2012 Sep;61(Pt 9):1179-1193. DOI: 10.1099/jmm.0.043513-0
4. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1;33(Database issue):D325-8. DOI: 10.1093/nar/gki008
5. Yushchuk ND, Martynov YuV, Kukhtevich EV, Kulagin MG. Pishchevye toksikoinfeksii. Pishchevye otravleniya. M.: GEOTAR-Media Publ., 2017. (In Russian).
6. Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. Chem Immunol. 1992;55:1-35.
7. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr Med Chem. 2009;16(30):4003-19. DOI: 10.2174/092986709789352321
8. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int. 2014;2014:827965. DOI: 10.1155/2014/827965
9. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar 31;2(1):63-76.
10. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарные правила и нормативы. СанПиН 2.3.2.1078–01. Введ. 2002-07-01. М., 2002. (In Russian).
11. ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*». М.: Стандартинформ Publ., 2016. (In Russian).
12. ГОСТ 31746-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. Межгосударственный стандарт. Введ. 2013-07-01. М.: Стандартинформ, 2013. (In Russian).
13. Polosenko OV, Shepelin AP, Azhermacheva NI, Abaev IV. Clinical trials of new culture media for staphylococcus isolation. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(2):115-121. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121 (In Russian).
14. Botalov NS, Chepkasova NI, Nekrasova YE. Methods of identification and determination of quantity of *Staphylococcus aureus* in foodstuffs. Mezhdunarodnyi studencheskii nauchnyi vestnik. 2018;5:37. (In Russian).
15. Mikrobiologicheskii kontrol' kachestva pishchevoi produktsii. Kollektivnaya monografiya. Pod red. Popovoi AYU, Dyatlova IA. M.: Dinastiya Publ., 2020; 96-102. (In Russian).
16. Giolitti G, Cantoni C. A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. J Appl Bacteriol. 1966 Aug;29(2):395-8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1966.tb03488.x
17. МУК 4.2.2316–08 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. Введ. 2008-01-18. М.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidnadzora Rospotrebnadzora, 2008. (In Russian).

Информация о соавторах:

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сёмина Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Mikhail V. Khramov, PhD, MD, deputy director for quality and development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anastasia Yu. Semina, Junior Researcher, Microbiological Research Sector, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Порядок проведения оценки защитной эффективности инженерных систем биологической безопасности в лабораториях с различным уровнем биологической защиты

О.Б.Шишкина, Е.А.Тюрин, С.А.Благодатских, А.А.Лебедькова

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

В статье рассматриваются вопросы оценки эффективности некоторых инженерных систем биологической безопасности (ограждающих строительных конструкций, общеобменной вентиляции и боксов микробиологической безопасности) в лабораториях 1–4-го уровня биологической безопасности. Определены этапы проведения оценки эксплуатационных характеристик инженерных систем. Обращается внимание на необходимость применения определенного набора тестов, которые используются при проведении оценки в комплексе или частично в зависимости от уровня защиты, а также на уровень подготовленности инженерно-технического персонала при проведении этих работ.

Ключевые слова: инженерные системы биологической безопасности, уровни, ограждающие строительные конструкции, вентиляция, боксы микробиологической безопасности, эффективность, оценка

Для цитирования: Шишкина О.Б., Тюрин Е.А., Благодатских С.А., Лебедькова А.А. Порядок проведения оценки защитной эффективности инженерных систем биологической безопасности в лабораториях с различным уровнем биологической защиты. Бактериология. 2024; 9(3): 52–56. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-52-56

Procedure for assessing the protective efficiency of engineering systems of biological safety in laboratories with different levels of biological protection

O.B.Shishkina, E.A.Tyurin, S.A.Blagodatskikh, A.A.Lebedkova

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

The article discusses the issues of assessing the effectiveness of some engineering systems of biological safety (enclosing building structures, general ventilation and microbiological safety boxes) in laboratories of 1-4 levels of biological safety. The stages of assessing the operational characteristics of engineering systems have been determined. Attention is drawn to the need to use a certain set of tests that are used in the assessment in complex or partially depending on the level of protection, as well as to the level of training of engineering and technical personnel during these works.

Key words: engineering systems of biological safety, levels, enclosing building structures, ventilation, microbiological safety cabinets, efficiency, assessment

For citation: Shishkina O.B., Tyurin E.A., Blagodatskikh S.A., Lebedkova A.A. Procedure for assessing the protective efficiency of engineering systems of biological safety in laboratories with different levels of biological protection. Bacteriology. 2024; 9(3): 52–56. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-52-56

Для корреспонденции:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-01-16
E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 19.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Evgeny A. Tyurin, MD, PhD, Senior Researcher, Leading researcher of the Biological safety laboratory 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) 36-01-16
E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 19.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

Современная микробиологическая, бактериологическая или вирусологическая (научно-исследовательская, диагностическая, биотехнологическая) лаборатория является сложным инженерно-техническим комплексом, который насыщен различным оборудованием, инженерными системами жизнеобеспечения и инженерными системами, обеспечивающими биологическую безопасность (ББ) при проведении работ с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности) [1–6]. Для полноценного использования оборудования и обеспечения требований ББ при проведении работ с патогенными биологическими агентами (ПБА) бактериальной и/или вирусной природы в ней должны быть созданы следующие условия:

- качественная изоляция внутреннего контура и герметизация внешнего контура «заразных» помещений лаборатории;
- организованная система вытяжной вентиляции для обеззараживания воздуха от аэрозолей патогенных микроорганизмов;
- применение защитного оборудования (боксов, вытяжных шкафов и т.п.) для локализации и защиты персонала в рабочей зоне;
- использование средств индивидуальной защиты тела и органов дыхания;
- безопасное использование стандартного и нестандартного лабораторного оборудования.

Для выполнения вышеперечисленных условий необходимо обеспечить внутреннюю и внешнюю ББ средствами инженерной линии защиты [2, 6, 7] по следующим направлениям:

- ограждающие строительные конструкции (ОСК);
- средства, обеспечивающие нераспространение и сдерживание биологических аэрозолей (вентиляция, боксы микробиологической безопасности (БМБ)), чтобы изолировать, локализовать, удерживать ПБА;
- средства, обеспечивающие нераспространение жидких и твердых отходов (передаточные устройства).

Кроме функционирования биологической линии защиты, в лаборатории необходимо грамотно эксплуатировать системы жизнеобеспечения, которые обеспечивают холодное и горячее водоснабжение, водоотведение, электроснабжение, пар, сжатый воздух и оборотную воду [2]. Наряду с системами жизнеобеспечения комплекс инженерных систем ББ должен обеспечивать безопасную работу сотрудников лаборатории в «заразных» помещениях лаборатории, что, в свою очередь, возможно только в результате безотказной работы инженерных систем и технологического оборудования специального назначения, обеспечивающих высокий уровень ББ, и грамотного исполнения своих обязанностей специалистами инженерно-технического профиля [2, 7–9].

В соответствии с нормативной документацией все микробиологические лаборатории (медицинские, ветеринарные, биологические) делятся на четыре уровня по степени насыщенности инженерными системами ББ [10–12]:

- уровень биологической безопасности (УББ) 1 – лаборатории базовые (по международной классификации – учебные): выполнение всех видов работ с ПБА IV группы;
- уровень биологической безопасности (УББ) 2 – лаборатории базовые: выполнение всех видов работ с ПБА III–IV

группы, а также проведение работ с ПБА II группы без накопления (культивирование или концентрирование) жизнеспособного ПБА;

- уровень биологической безопасности (УББ) 3 – лаборатории изолированные: выполнение всех видов работ с ПБА I (возбудитель чумы) и ПБА II группы, а также проведение работ с вирусами I группы патогенности, без накопления (культивирование или концентрирование) жизнеспособного ПБА;
- уровень биологической безопасности (УББ) 4 – лаборатории максимально изолированные: выполнение всех видов работ с вирусами I группы патогенности; микроорганизмами, ассоциированными с клиническими проявлениями, характерными для ПБА I–II групп, таксономическое положение которых не определено, а степень опасности не изучена; экспериментальные исследования штаммов ПБА с множественной устойчивостью к антибиотикам и химиопрепаратам, а также аэриобиологические исследования с ПБА I–II групп.

Для уменьшения риска выхода ПБА за пределы контура изоляции (герметизации) лаборатории необходимо постоянно контролировать эффективность работы защитных систем и средств, входящих в барьерные системы (ОСК, вентиляция, БМБ и т.п.). Для этого в лабораториях различных уровней защиты необходимо создать те условия, которые могут обеспечить функционирование комплекса защитных мер [6, 9]:

- постоянный контроль эффективности работы инженерных систем;
- применение правил безопасной работы, основанных на соблюдении положений и требований нормативно-методических документов;
- наличие обученного и подготовленного персонала лаборатории и инженерно-технической службы обеспечения работ;
- постоянное поддержание высоких требований к состоянию здоровья персонала и контроль за ним, а также проведение специфической профилактики (при необходимости);
- наличие средств инженерно-технического оснащения для сдерживания ПБА в соответствии с поставленными задачами.

Как показывает практика, все инженерные системы, предусмотренные нормативной документацией для лабораторий, необходимы и целесообразны, так как они создают комплекс, обеспечивающий безопасность персонала и окружающей среды при проведении работ с ПБА I–IV групп [9]. Однако нужно выделить несколько обязательных систем, без которых современная лаборатория работать не может. Это системы, обеспечивающие контур изоляции (герметизации):

- ОСК;
- механическая приточно-вытяжная общеобменная вентиляция с высокоэффективными фильтрами очистки воздуха класса H13 на притоке и H14 на удалении;
- БМБ II–III классов.

Испытания вентиляционных систем, проведенные в различных учреждениях биологической направленности (ветеринарные, пищевые и т.п.), показали, что 95% эксплуатируемого вентиляционного оборудования на момент проведе-

ния испытаний не соответствовало критериям безопасности положений, изложенным в СанПиН 3.3686-21 [12]. Был выявлен ряд нарушений, которые были наиболее характерны и на которые обратили внимание сотрудники, проводившие испытания: качество монтажа при установке фильтр-элементов, качество изготовления модулей вентиляционных камер и совокупный фактор.

Цель работы. Определить порядок проведения испытаний по оценке работоспособности и защитной эффективности инженерных систем ББ и представить наиболее показательные тесты, проводимые для их сертификации в микробиологических лабораториях различных уровней защиты.

Материалы и методы

Основным методом исследований являлся как эпидемиологический анализ эксплуатационных характеристик инженерных систем ББ, так и оценка защитной эффективности систем и элементов, выявленных в периоды их проверки в лабораториях различных уровней защиты. Также объектами исследования являлись нормативно-методические материалы, санитарно-эпидемиологические правила, внутренние инструкции и стандартные операционные процедуры по работе с ПБА I–IV групп, паспорта на системы и элементы инженерных систем, протоколы проведенных испытаний и анализ полученных результатов.

Результаты исследования и их обсуждение

Для каждого уровня ББ определен комплекс оценочных мероприятий и процедур, позволяющий всесторонне оценить работоспособность и защитную эффективность инженерных систем и механизмов, которые в них входят, и сделать соответствующее положительное или отрицательное заключение. Соответственно, всю процедуру испытаний (сертификации) инженерных систем ББ (ОСК, вентиляции и БМБ) можно разделить на три этапа:

- 1) подготовительный;
- 2) рабочий;
- 3) заключительный.

Выполнение процедуры подготовительного этапа при проведении контрольных мероприятий и сертификации на инженерных системах ББ почти полностью ложится на плечи персонала лаборатории, так как необходимо провести полную дезинфекционную обработку помещения лабораторных блоков и лаборатории в целом, не исключая вспомогательные помещения, такие как коридор, учитывая наличие «мертвых» вентиляционных зон, и подготовить оборудование к испытаниям. Дезинфекцию выполняют проинструктированные сотрудники, используя штатный рабочий раствор дезинфектанта. В качестве средств защиты используют защитную одежду и средства индивидуальной защиты органов дыхания и глаз. После окончания дезинфекции составляется акт, который является основанием для допуска в помещение лаборатории специалистов инженерного профиля после соответствующей временной экспозиции. Их допускают в лабораторию в сопровождении ответственного сотрудника лаборатории. Первое, что должен сделать инженер, – это оценить вентиляционный режим лаборатории. Этот режим дол-

жен соответствовать штатному режиму работы вентиляции, предусмотренному для того или иного уровня безопасности и вида лаборатории (диагностическая или экспериментальная), и создавать разрежение от 50 до 100–150 Па. Специалисты инженерной службы проводят визуальный осмотр помещений для определения мест и оценки доступа к местам контроля оборудования: воздуховодам, вентиляционным камерам, боксам. Специалисты предъявляют сотрудникам лаборатории сертификаты и поверочные акты на оборудование и приборы, которыми будут пользоваться при проведении контрольных мероприятий и испытаний на предъявляемых инженерных системах ББ.

Рабочий этап проведения работ выполняют специалисты инженерно-технического отдела организации, если лаборатория соответствует уровню для работы с микроорганизмами, относящимися к IV группе патогенности (УББ 1). В случае, если в лаборатории работают с микроорганизмами I–IV групп патогенности, оценку проводят представители организации или фирмы, с которыми заключен контракт/договор о проведении контрольных мероприятий и испытаниях предъявляемых инженерных системах ББ.

Необходимо помнить о том, что к проведению второго этапа работ желательно допускать инженерно-технический персонал, имеющий представление о биологической составляющей лаборатории, о том, с какими микроорганизмами работают в боксах «заразной» зоны, их свойствах и особенностях. Они должны иметь хотя бы минимальные представления и базовые знания, подтвержденные соответствующими курсами. Желательно, чтобы специалисты, проверяющие лаборатории уровня 2–4, имели соответствующие специфические профилактические прививки и документ, подтверждающий обучение на курсах повышения квалификации, а также были допущены к работам с ПБА на основании приказа руководителя своей организации, копия которого предъявляется сотрудникам лаборатории. Последнее положение выполнить достаточно трудно, так как подобных специалистов очень мало, а привитых нет вообще. В соответствии с положениями требований ББ всех специалистов инженерно-технического профиля допускают в «заразные» помещения лаборатории только после инструктажа и входного медицинского осмотра с измерением температуры тела, в сопровождении выделенных для этого сотрудников. Все данные заносят в специальный журнал [12].

Выполнение рабочего этапа начинают со знакомства с имеющейся инженерно-технической документацией на системы и оборудование, которое подлежит испытаниям: раздѣлами проекта по общеобменной вентиляции, паспортами на инженерные системы приточной и вытяжной вентиляции, актами ранее проведенных испытаний, паспортами на БМБ, паспортами на высокоэффективные фильтры очистки воздуха, актами проведенной дезинфекции и результатами ее эффективности. После ознакомления с представленными документами и их анализом приступают непосредственно к проведению работ в помещениях «заразной» зоны, выполняя процедуры по проверке и испытанию представляемого оборудования.

Говоря о системе приточно-вытяжной вентиляции, нельзя не упомянуть о месте расположения элементов этой системы, т.е. о пространстве, которое ограничено стенами, полом

и потолком, т.е. о герметичных изолирующих ОСК. Они создаются в лаборатории для изоляции ПБА и недопущения их проникновения через ОСК из рабочих помещений «заразной» зоны в смежные помещения «заразной» и «чистой» зон и/или во внешнюю окружающую среду. К сожалению, достичь 100%-й герметизации крайне сложно. Это зависит от материалов, из которых сделаны стены помещений, качества отделки, нанесения герметика, покраски и т.п. [1]. Поэтому корректнее говорить об изоляции рабочих помещений. Ограждающие строительные конструкции группы помещений «заразной» зоны составляют наружный, или первичный, контур изоляции (герметизации). Внутренний, или вторичный, контур изоляции (герметизации) составляют строительные ограждения отдельных смежных помещений (блоков) внутри «заразной» зоны лаборатории. Контур изоляции (герметизации) должен проверяться не реже одного раза в год специалистами инженерно-технического профиля. В случае обнаружения мест нарушения качества контура они герметизируются и контур проверяют повторно.

БМБ являются первым барьером, защищающим сотрудников лаборатории, работающих с ПБА, от их опасного воздействия, и поэтому отношение к этому техническому элементу безопасности в лаборатории должно быть основательным и взыскательным. БМБ проверяют или сертифицируют не реже одного раза в год, а также во время установки БМБ до ввода в эксплуатацию. Бокс сертифицируют после его переноса/перестановки в другое место, так как при переносе фильтры HEPA могут повредиться или сместиться с посадочных мест, а также после профилактического ремонта и/или замены отдельных внутренних деталей (электронная плата, электродвигатель, HEPA-фильтр).

Сертификацию бокса начинают с оценки места его установки. Бокс должен быть размещен так, чтобы не было дополнительного возмущения воздушных масс в помещении лаборатории при перемещении персонала, чтобы тем самым не нарушалась тонкая воздушная завеса рабочей камеры бокса и не возникали турбулентные потоки воздуха, мешающие выполнению работ с ПБА. После оценки местоположения бокса приступают к измерениям скоростей входящего и нисходящего воздушных потоков в его рабочей камере. Эти процедуры выполняют при помощи приборов (лепестковый анемометр и термоанемометр), которые должны быть поверены и срок их поверки был достаточен для проведения испытаний.

Распределение входящего динамического воздушного потока в рабочую камеру проводят при помощи визуального дымового теста. Дым – это видимый аэрозоль, который является единственным средством для визуализации воздушного потока и позволяет в полной мере определить его распространение в рабочей камере бокса. Источником дыма могут служить специальные устройства или подручные средства (дымовые индикаторы). Основное требование – видимый аэрозоль дыма должен быть стабильным и устойчивым, что позволяет видеть распределение воздушного потока в рабочей камере бокса и оценить его распространение.

Следующим шагом при проведении сертификации являются проведение проверки целостности HEPA-фильтра и оценка его эффективности. Для выполнения этих процедур

используют счетчик аэрозольных частиц в комплексе с генератором аэрозоля ФАН и измерителем комбинированным Testo-435-1 или их аналоги. HEPA-фильтр сканируют датчиком, подсоединенным к счетчику аэрозольных частиц, оценивая всю поверхность фильтра. В качестве аэрозоля, который запускают «ДО» фильтра, используют масляный аэрозоль (турбинное масло, диактилфталат и т.п.), который возгоняют до определенного стандартного значения размеров частиц. Полученные результаты оценивают в соответствии с методикой измерений [1].

Герметичность БМБ определяют методом наддува воздуха в рабочую камеру и внутренние полости бокса (пленум). Предварительно все места соединений (крышку рабочей камеры, контакт защитного стекла с корпусом, отверстия в верхней части бокса и т.п.) заклеивают широкой малярной лентой типа «скотч» или иным фиксирующим и герметизирующим материалом. Убедившись в полной герметизации, при помощи воздуходувки в бокс нагнетают воздух с избыточным давлением в 30% от объема рабочей камеры. Падение давления контролируют по U-образному манометру: не более чем на 10% в течение 30 минут. В случае падения давления на большую величину становится ясным, что бокс негерметичен. Если падения давления нет, это свидетельствует об отсутствии утечек и герметичности бокса, при отсутствии отрицательных результатов других тестов бокс может быть принят к дальнейшей эксплуатации. Кроме обязательных тестов сертификации, используют дополнительные тесты на вибрацию столешницы, шум, производимый электродвигателем, и освещенность рабочего поля столешницы.

Третий этап проведения испытаний – это обработка полученных результатов и оформление необходимых документов (акты, протоколы). Если весь комплекс проведенных тестов не выявил отрицательных значений, составляется протокол с подписями всех компетентных специалистов, в т.ч. и со стороны лаборатории, который передается руководству лаборатории, а на лицевую часть бокса помещают табличку – сертификат о том, что бокс соответствует требованиям для работ с микроорганизмами, с которыми работают в данной лаборатории в зависимости от уровня безопасности. Кроме того, после завершения испытаний необходимо провести соответствующую уборку рабочего помещения, проветрить его и сдать сотрудникам лаборатории в соответствующем виде.

Заключение

Полученный опыт проведения мероприятий по оценке состояния и защитной эффективности инженерных систем ББ на объектах и в лабораториях различных уровней защиты позволяют сделать некоторые выводы и высказать некоторые предложения. Так, деятельность инженерно-технического персонала (эксплуатационная, контрольная, ремонтная), направленная на снижение биологических рисков, должна быть высокопрофессиональной, с применением высокоэффективных инженерно-технических средств в решении проблем защиты среды обитания человека от выхода ПБА [6, 9]. На наш взгляд, для управления биологическими рисками, вероятно, следует уделить внимание следующим положениям ББ:

- сертификационные испытания инженерных систем ББ должны проводиться в соответствии с установленным порядком проведения работ с учетом всех факторов, требований ББ и нормативной документации;
- подготовку и установку элементов систем вентиляции (фильтров) в вентиляционные камеры и БМБ следует доверять только высокопрофессиональным специалистам, подготовленным для этой работы;
- готовя техническое задание для проведения работ по замене и сертификации высокоэффективных фильтров очистки воздуха для инженерных систем ББ, необходимо указывать уровень подготовки инженерно-технических работников и опыт в проведении подобных мероприятий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Найдёнов АЯ. Безопасность работ в микробиологических лабораториях. Защитная эффективность инженерных систем безопасности. М.: ДеЛи плюс, 2013.
2. Дроздов СГ, Гарин НС, Джиндоян ЛС, Тарасенко ВМ. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина, 1987.
3. Тюрин ЕА. Обеспечение требований биологической безопасности на биологически опасном объекте. Биозащита и биобезопасность. 2013;2:34-42.
4. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd Edition. Canada. 2004.
5. Дмитриева ВА, Боронин АМ, Дмитриев ВВ, Доброхотский ОН, Жариков ГА, Коломбет ЛВ, и др. Учебное пособие по биобезопасности. Пушchino; Тула: Изд-во ТулГУ, 2013.
6. Тюрин ЕА, Шишкина ОБ, Артеменко ЕВ. Современные требования к условиям эксплуатации инженерных систем биологической безопасности в учреждениях ветеринарии. Ветеринария. 2021;10:44-48. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.10.44-48
7. Тюрин ЕА, Чекан ЛВ, Маринин ЛИ, Дятлов ИА. Профессиональный риск сотрудников микробиологических лабораторий и меры его снижения. Анализ риска здоровья. 2014;3:44-50.
8. Тюрин ЕА. Индивидуальные и коллективные факторы биобезопасности. Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2010;V(4):148-53.
9. Санитарные нормы и правила «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» СП 3.3686-21. 2021.
10. Тюрин ЕА, Шишкина ОБ, Чекан ЛВ. Комплексное участие инженерно-технической службы потенциально опасного биологического объекта в процессе обеспечения биологической и экологической безопасности. Сборник материалов XIV Международной научно-технической конференции «Наука, образование, производство в решении экологических проблем» (Экология-2018). 2018;1:266-78.
11. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. 4-е изд. Всемирная организация здравоохранения. Женева, 2020.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th Edition. USA. Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. 2020.

References

1. Naidenov AYa. Bezopasnost' rabot v mikrobiologicheskikh laboratoriyakh. Zashchitnaya effektivnost' inzhenernykh sistem bezopasnosti. M.: DeLi plus Publ., 2013. (In Russian).
2. Drozdov SG, Garin NS, Dzhindoyan LS, Tarasenko VM. Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh. M.: Meditsina Publ., 1987. (In Russian).
3. Tyurin EA. The securing of requirements of biological safety on biologically dangerous objects. Biozashchita i biobezopasnost'. 2013;2:34-42. (In Russian).
4. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd Edition. Canada. 2004.
5. Dmitrieva VA, Boronin AM, Dmitriev VV, Dobrokhotskii ON, Zharikov GA, Kolombet LV, et al. Uchebnoe posobie po biobezopasnosti. Pushchino; Tula: TulGU, 2013. (In Russian).
6. Tyurin EA, Shishkina OB, Artemenko EV. Modern requirements for the life of the engineering systems of the world in veterinary institutions. Veterinariya. 2021;10:44-48. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.10.44-48 (In Russian).
7. Tyurin EA, Checkan LV, Marinin LI, Dyatlov IA. Professional risks faced by microbiological laboratory workers and their mitigation measures. Health Risk Analysis. 2014;3:44-50. (In Russian).
8. Tyurin EA. Individual'nye i kollektivnye faktory biobezopasnosti. Zhizn' bez opasnostei. Zdorov'e. Profilaktika. Dolgoletie. 2010;V(4):148-53. (In Russian).
9. Sanitarnye normy i pravila «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei» SP 3.3686-21. 2021. (In Russian).
10. Tyurin EA, Shishkina OB, Chekan LV. Kompleksnoe uchastie inzhenerno-tekhnicheskoi sluzhby potentsial'no opasnogo biologicheskogo ob'ekta v protsesse obespecheniya biologicheskoi i ekologicheskoi bezopasnosti. Sbornik materialov XIV Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii «Наука, образование, производство в решении экологических проблем» (Экология-2018). 2018;1:266-78. (In Russian).
11. Prakticheskoe rukovodstvo po biologicheskoi bezopasnosti v laboratornykh usloviyakh. 4-e izd. Vsemirnaya organizatsiya zdavoookhraneniya. Zheneva, 2020. (In Russian).
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th Edition. USA. Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. 2020.

Информация о соавторах:

Шишкина Ольга Борисовна, ведущий инженер отдела эксплуатации и ремонта инженерных систем биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Благодатских Станислав Александрович, младший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Лебедькова Александра Андреевна, стажер-исследователь лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga B. Shishkina, Leading Engineer of the Department of Operation and Repair of Engineering Systems of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Stanislav A. Blagodatskikh, Junior Researcher, Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Alexandra A. Lebedkova, research intern at the biological safety laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Микробиологический мониторинг возбудителей нозокомиальных инфекций из группы ESCAPE в медицинских организациях г. Перми

Н.С.Боталов¹, Т.М.Некрасова¹, Н.И.Боталова², С.А.Лукьянцева¹, Т.И.Карпунина³

¹Бактериологическая лаборатория отдела обеспечения лабораторной деятельности ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае», Пермь, Российская Федерация;

²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Пермскому краю, Пермь, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера» Минздрава России, Пермь, Российская Федерация;

В каждом медицинском учреждении циркулируют те или иные микроорганизмы, которые представляют собой угрозу развития у пациентов инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Уровень колонизации ими больничных объектов при оценке бактериологическими методами составляет 5–36%. Дополнительную информацию можно получить с помощью поиска микроорганизмов из группы ESCAPE.

Целью работы было проведение анализа этиологической структуры возбудителей нозокомиальных инфекций в рамках внедрения системы микробиологического мониторинга в поиске микроорганизмов из группы ESCAPE в реанимационных отделениях крупных медицинских организаций г. Перми.

Результаты. Бактериологическим методом исследовано 1400 проб смывов с объектов внутрибольничной среды, из которых количество выделенных микроорганизмов составило 72 (5,1%), микроорганизмов из группы ESCAPE-патогенов – 50 (3,6%). Результаты исследования показали рост грамположительной флоры, в особенности *Enterococcus* spp. и *Staphylococcus aureus*, которые считаются госпитальными патогенами. *S. aureus* занимает лидирующую позицию в качестве этиологического агента (16,7%). Второе ранговое место – *Enterococcus faecalis* (15,3%), удельный вес *Enterococcus faecium* также был достаточно высок – 11,1%, на третьем месте – *Pseudomonas aeruginosa* (12,5%). Доля представителей *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* составляла по 6,9%.

Заключение. Внедрение системы локального микробиологического мониторинга госпитальных штаммов позволяет своевременно и адекватно анализировать тенденции циркуляции микроорганизмов группы ESCAPE.

Ключевые слова: бактериологическое исследование смывов, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, микробиологический мониторинг, ESCAPE-патогены

Для цитирования: Боталов Н.С., Некрасова Т.М., Боталова Н.И., Лукьянцева С.А., Карпунина Т.И. Микробиологический мониторинг возбудителей нозокомиальных инфекций из группы ESCAPE в медицинских организациях г. Перми. Бактериология. 2024; 9(3): 57–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-57-61

Microbiological monitoring of ESCAPE group nosocomial infection agents in medical organizations of Perm

N.S.Botalov¹, T.M.Nekrasova¹, N.I.Botalova², S.A.Lukyantseva¹, T.I.Karpunina³

¹Bacteriological Laboratory of the Laboratory Support Department of the Perm Krai Center for Hygiene and Epidemiology, Perm, Russian Federation;

²Perm Krai Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Perm, Russian Federation;

³Academician E.A.Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Every health organization has some microorganisms that threaten patients with health-related infections. Their rate of colonization of hospital facilities with bacteriological methods ranges from 5 to 36 per cent. Further information can be received by searching for specific microorganisms, namely the ESCAPE microorganisms.

Для корреспонденции:

Боталов Никита Сергеевич, врач-бактериолог бактериологической лаборатории отдела обеспечения лабораторной деятельности ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае»

Адрес: 614016, Пермь, ул. Куйбышева, 50

Статья поступила 18.01.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Nikita S. Botalov, bacteriologist of the bacteriological laboratory of the department of laboratory activities support of the Federal Budgetary Institution of Health "Center for Hygiene and Epidemiology in Perm Krai"

Address: 50 Kuibyshev str., Perm, 614016, Russian Federation

The article was received 18.01.2024, accepted for publication 30.09.2024

The aim of the work was to analyze the etiological structure of pathogens of nosocomial infections as part of the implementation of the microbiological monitoring system in the search for microorganisms from the ESCAPE group in the intensive care units of major medical organizations in Perm.

Results. Bacteriological method investigated 1400 samples of flushing from objects of the hospital environment, of which the number of non-standard samples (detection of microorganisms) was 5.1%, for microorganisms from group ESCAPE pathogens – 3.6%. The study showed an increase in gram-positive flora, especially *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus aureus*, which are considered hospital pathogens. *S. aureus* is the leading etiological agent (16.7%). In the second place – *Enterococcus faecalis* (15.3%), the weight of *Enterococcus faecium* was also quite high – 11.1%, in third place – *Pseudomonas aeruginosa* (12.5%). The share of representatives of microorganisms *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* was 6.9%.

Conclusion. The introduction of local microbiological monitoring of hospital strains allows timely and adequate analysis of circulation trends of ESCAPE microorganisms.

Key words: bacteriological research of fluids, infections associated with the provision of medical care, microbiological monitoring, ESCAPE-pathogens

For citation: Botalov N.S., Nekrasova T.M., Botalova N.I., Lukyantseva S.A., Karpunina T.I. Microbiological monitoring of ESCAPE group nosocomial infection agents in medical organizations of Perm. Bacteriology. 2024; 9(3): 57–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-57-61

Актуальность инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), определяется их широким распространением, негативными последствиями для здоровья и жизни пациентов и медицинского персонала, экономики системы здравоохранения. Резистентные штаммы микроорганизмов и обусловленные ими инфекции являются одной из важнейших проблем мирового здравоохранения на современном этапе [1, 2]. Микробиологический мониторинг как система оценки циркуляции возбудителей ИСМП и выявления изменений в их структуре имеет решающее значение в вопросах расшифровки эпидемиологических связей при расследовании случаев внутрибольничного заражения, разработки профилактических и противоэпидемических мероприятий [3, 4]. В этой связи самого пристального внимания заслуживает группа бактерий ESCAPE [5, 6]. Первоначально аббревиатура ESKAPE, введенная CDC (Центры по контролю и профилактике заболеваний США) [7], обозначала группу, включающую *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. *Escherichia coli* зачастую тоже учитывали в исследованиях возбудителей ESKAPE (тогда называемых ESKAPE-E) [8, 9]. Позднее L.R.Peterson (2009) предложил заменить термин ESKAPE на ESCAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *Clostridium difficile*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и энтеробактерии) [10]. Включение *C. difficile* в качестве новой буквы «С» признавало эту инфекцию одним из проблемных заболеваний, и это включение оправдано, поскольку она является одной из наиболее распространенных внутрибольничных инфекций. Что касается включения *Enterobacteriaceae* в патогены ESCAPE в качестве новой конечной буквы «Е», то эта новая терминология охватывает не только виды *K. pneumoniae* (бывшая «К») и виды *Enterobacter* spp. (бывшая последняя «Е»), но и другие критически важные патогены, которые могут проявлять повышение уровня устойчивости к антибиотикам (включая β-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы), устойчивость к аминогликозидам и снижение чувствительности к фторхинолонам (а именно: виды *E. coli* и *Proteus* spp.) [5, 11]. В Российской Федерации, согласно требованиям п. 3397 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», наиболее частыми этиологическими аген-

тами ИСМП являются условно-патогенные микроорганизмы из группы ESCAPE: *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *C. difficile*, представители семейства *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp.).

Термин ESCAPE (англ. «ускользать, избегать») подчеркивает тот факт, что микроорганизмы из этой группы эффективно «ускользают» от воздействия антибактериальных препаратов и во всем мире представляют особую проблему с точки зрения роста уровня антибиотикорезистентности [8, 12, 13]. Проблемные инфекции, вызванные патогенами из группы ESCAPE, в большей части случаев являются прерогативой отделений реанимации и интенсивной терапии и характеризуются высокой устойчивостью к большинству применяемых антимикробных препаратов.

Цель исследования – анализ этиологической структуры возбудителей нозокомиальных инфекций в рамках внедрения системы микробиологического мониторинга в поиске микроорганизмов группы ESCAPE в реанимационных отделениях крупных медицинских организаций г. Перми.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» в соответствии с МУК 4.2.2942-11 «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях». Изучено 1400 проб из реанимационных отделений многопрофильных больниц г. Перми. Наибольшее количество проб было отобрано в Пермском краевом онкологическом диспансере, Городской клинической больнице им. М.А.Тверье, Пермской краевой клинической больнице.

Отбор проб с поверхностей различных объектов осуществлялся методом смывов, выполненных посредством стерильных ватных тампонов, смонтированных в пробирки. Для увлажнения тампонов использовали 0,1%-ю стерильную пептонную воду с добавлением нейтрализаторов дезинфицирующих средств. Пробы отбирались с наиболее значимых в эпидемиологическом плане объектов: рук и спецодежды медицинского персонала, кнопок перфузора, ручек дозато-

ров, мониторов аппаратов ИВЛ, манипуляционных столиков, дверных ручек, спинок кроватей пациентов, штативов для внутривенных инфузий, консолей, панелей раковин, локтевых смесителей.

В соответствии с МУК 4.2.2942-11 для обнаружения стафилококков 0,2–0,3 мл смывной жидкости высевали в пробирки с 5,0 мл среды №8 (бульон для накопления стафилококков и синегнойной палочки). Засеянные пробирки инкубировали при 37°C в течение 24 ± 2 ч, после чего производили посевы на желточно-солевые среды. Для обнаружения синегнойной палочки дополнительно использовали среду №9 (по наличию пигмента пиоцианина), бактерий группы кишечных палочек – 0,2–0,3 мл смывной жидкости вносили в пробирки с 5,0 мл среды Кесслера. Засеянные пробирки инкубировали при 37°C в течение 24 ± 2 ч с последующим пересевом на среду Эндо. Для обнаружения прочих условно-патогенных микроорганизмов высевали 1 мл смывной жидкости в пробирки с 5,0 мл 0,5%-го сахарного бульона, инкубировали при 37°C в течение 24 ± 2 ч, переносили микробные взвеси на 5%-й кровяной агар. С чашечных сред отбирали «подозрительные» колонии, с последующей идентификацией изолированных культур как с использованием классических бактериологических методов (изучение морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств), так и при помощи системы Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия), позволяющей проводить идентификацию более 360 видов микроорганизмов с использованием коммерческих тест-систем «Микро-ЛА-Тест» (Lachema, Чешская республика).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализируемые данные получены в рамках микробиологического мониторинга и эпидемиологических исследований в реанимационных отделениях в ряде медицинских организаций г. Перми за период с ноября 2022 г. по ноябрь 2023 г. Бактериологическим методом выделены и идентифицированы 72 (5,1%) бактериальные культуры, из которых 50 (3,6%) относились к группе ESCAPE-патогенов.

Наиболее частыми местами локализации возбудителей оказались: раковины (моечный кран, панель раковины, смеситель крана, локтевой смеситель, смыв с дозаторов для мыла) – 15 (20,8%), трубки электроотсосов – 5 (6,9%), аппараты ИВЛ (дыхательная трубка, панель монитора, внешняя поверхность дыхательного контура) – 13 (18,1%).

Таблица. Представители ESCAPE-патогенов, изолированных в отделениях реанимации
 Table. Representatives of ESCAPE pathogens isolated in intensive care units

Микроорганизм / Microorganism	Количество / Quantity	%
<i>S. aureus</i>	12	16,7
+ <i>E. faecalis</i>	11	15,3
<i>E. faecium</i>	8	11,1
<i>P. aeruginosa</i>	9	12,5
<i>A. baumannii</i>	5	6,9
<i>K. pneumoniae</i>	5	6,9
Прочие / Others	22	30,6

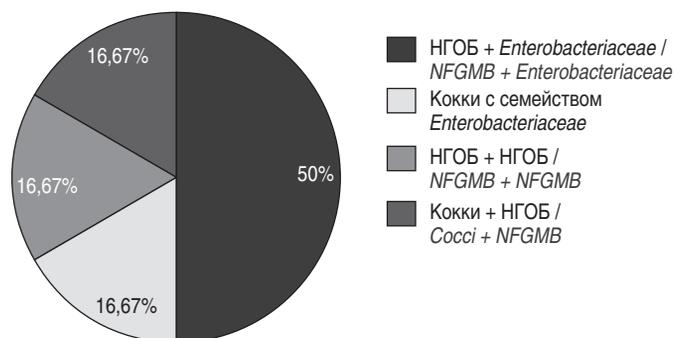


Рисунок. Варианты ассоциаций микроорганизмов.
 Figure. Variants of microorganism associations.

Структура всех выделенных штаммов характеризовалась преобладанием грамположительной кокковой флоры (63,9%), на долю возбудителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 12,5%, неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) – 23,6%.

Микроорганизмы выделяли как в монокультуре – 48 (66,7%), так и в ассоциациях – 24 (33,3%), в которых наиболее часто встречались сочетания НГОБ с представителями *Enterobacteriaceae* – 50,0%, кокки с энтеробактериями, кокки + НГОБ, а также НГОБ + НГОБ – по 16,67% (рисунок).

Видовой состав выделенных в рамках проведенного нами исследования микроорганизмов представлен в таблице.

При изучении микробного спектра смывов наиболее частым возбудителем представителем из группы ESCAPE-патогенов являлся *S. aureus*, доля которого составила 16,7%, что косвенно указывает на преобладание в этиологической структуре микроорганизмов, контаминирующих кожные покровы (типичным представителем которых является золотистый стафилококк). Удельный вес других грамположительных кокков (*E. faecalis* и *E. faecium*) также был достаточно высок – 15,3 и 11,1% соответственно. В составе грамотрицательных палочек преобладали НГОБ (19,4%): доля *P. aeruginosa* составила 12,5% от общего количества изолятов, *A. baumannii* – 6,9%. Представительство энтеробактерий в этиологической структуре, согласно нашим данным, за исключением *K. pneumoniae* (6,9%) оказалось минимальным. Не было изолировано ни одного штамма *E. coli*.

Среди прочих изолированных культур лидировали эпидермальные стафилококки (11,1%), в трех случаях выделили *Streptococcus* spp. Как единичные находки были отмечены достаточно редкие представители НГОБ, в их числе *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas mendocina*, *Acinetobacter calcoaceticus*, а также бактерии из семейства *Enterobacteriaceae*: *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* и другие.

Заключение

Общепризнано, что этиология ИСМП и антибиотикорезистентность их возбудителей разнообразны как в различных регионах, так и в стационарах различного профиля. В анализируемый период времени видовая структура штаммов, выделенных в реанимационных отделениях г. Перми, характеризовалась преобладанием бактерий группы ESCAPE с доминированием грамположительной кокковой флоры (>60%

выделенных штаммов), в т.ч. доля *S. aureus* составила 16,7%, *E. faecalis* – 15,3%, *P. aeruginosa* – 12,5%, *E. faecium* – 11,1%, *A. baumannii* и *K. pneumoniae* – по 6,9%. Таким образом, внедрение системы локального микробиологического мониторинга госпитальных штаммов позволяет своевременно и адекватно анализировать тенденции циркуляции микроорганизмов группы ESCAPE, подтверждать этиологическую роль отдельных штаммов в развитии ИСМП, устанавливать эпидемиологические связи между случаями заноса инфекции, прогнозировать эпидемиологическую ситуацию, регулярно корректировать перечни этиологических агентов, подлежащих эпидемиологическому надзору.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Акимкин ВГ, Тутельян АВ. Актуальные направления научных исследований в области инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Здоровье населения и среда обитания. 2018;4(301):46-50. DOI: 10.35627/2219-5238/2018-301-4-46-50
- Шаталова ЕВ, Парахина ОВ, Красноухов АИ. Значимость микробиологического мониторинга в современной системе профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Антибиотики и химиотерапия. 2017;62(11-12):35-38.
- Тутельян АВ, Шулакова НИ. Фундамент и горизонты профилактики ИСМП. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2023;13(2):21-27. DOI: 10.18565/epidem.2023.13.2.21-7
- Тимошевский АА. Инфекционная безопасность в медицинской организации. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Учебно-методическое пособие для обучающихся по направлениям медицинского образования: электронный ресурс. 2023. Режим доступа: <https://niiioz.ru/moskovskaya-meditsina/izdaniya-nii/metodicheskie-posobiya/> [Дата обращения: 20.12.2023].
- Габриэлян НИ, Шарапченко СО, Кисиль ОВ, Кормилицина ВГ, Драбкина ИВ, Сафонова ТБ, и др. Вопросы эпидемиологии в проблеме антибиотикорезистентности клинических патогенов. Медицинский алфавит. 2020;34:6-8. DOI: 10.33667/2078-5631-2020-34-6-8
- Плоткин ЛЛ, Молчанова ИВ, Чумаков ПГ, Рахманов МЮ, Тюрин АЮ, Марченко ЮМ. Инфекция, вызванная *Acinetobacter baumannii*, в отделениях реанимации и интенсивной терапии многопрофильного госпиталя. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2017;14(6):22-27. DOI: 10.21292/2078-5658-2017-14-6-22-27
- Suguna M, Umesha S. ESCAPE Pathogens: Infection, Mode of Resistance and Its Cure. Developments Clin Med Pathol. 2022;2(2). DOI: 10.31031/DCMP.2022.02.000532
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESCAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Mar;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12

- Скачкова ТС, Шипулина ОЮ. Обзор молекулярно-биологических методов для выявления ESKAPE-патогенов. Клиническая патофизиология. 2018;24(1):25-28.
- Peterson LR. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. Clin Infect Dis. 2009;49(6):992-3. DOI: 10.1086/605539
- Прушинский АП. Опыт внедрения системы микробиологического мониторинга за возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи многопрофильной детской больницы. МедиАль. 2018;2(22):16-20.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011
- Яровой СК, Восканян ШЛ, Тутельян АВ, Гладкова ЛС. Роль активного эпиднадзора в выявлении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2019;9(3):32-38. DOI: 10.18565/epidem.2019.9.3.32-8

References

- Akimkin VG, Tutel'yan AV. Current directions of scientific researches in the field of infections, associated with the medical care, at the present stage. Public Health and Life Environment. 2018;4(301):46-50. DOI: 10.35627/2219-5238/2018-301-4-46-50 (In Russian).
- Shatalova EV, Parakhina OV, Krasnoukhov AI. The importance of microbiological monitoring in the modern system of preventing healthcare-associated infections. Antibiotics and Chemotherapy. 2017;62(11-12):35-38. (In Russian).
- Tutelian AV, Shulakova NI. The foundation of and horizons for prevention of healthcare-associated infections. Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items. 2023;13(2):21-27. DOI: 10.18565/epidem.2023.13.2.21-7 (In Russian).
- Timoshevskii AA. Infektsionnaya bezopasnost' v meditsinskoi organizatsii. Infektsii, svyazannye s okazaniem meditsinskoi pomoshchi (ISMP): Uchebno-metodicheskoe posobie dlya obuchayushchikhsya po napravleniyam meditsinskogo obrazovaniya. 2023. [Electronic resource]. Available at: <https://niiioz.ru/moskovskaya-meditsina/izdaniya-nii/metodicheskie-posobiya/> (accessed 20.12.2023). (In Russian).
- Gabrielyan NI, Sharapchenko SO, Kisil OV, Kormilitsina VG, Drabkina IV, Safonova TB, et al. Epidemiology issues in problem of antibiotic resistance of clinical pathogens. Medical Alphabet. 2020;34:6-8. DOI: 10.33667/2078-5631-2020-34-6-8 (In Russian).
- Plotkin LL, Molchanova IV, Chumakov PG, Rakhmanov MYu, Tyurin AYu, Marchenko YuM. The infection caused by *Acinetobacter baumannii* in the intensive care units of a general hospital. Messenger of Anesthesiology and Resuscitation. 2017;14(6):22-27. DOI: 10.21292/2078-5658-2017-14-6-22-27 (In Russian).
- Suguna M, Umesha S. ESCAPE Pathogens: Infection, Mode of Resistance and Its Cure. Developments Clin Med Pathol. 2022;2(2). DOI: 10.31031/DCMP.2022.02.000532
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESCAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Mar;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12
- Skachkova TS, Shipulina OYu. A review of molecular-based methods for ESCAPE pathogens detection. Clinical Pathophysiology. 2018;24(1):25-28. (In Russian).
- Peterson LR. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. Clin Infect Dis. 2009;49(6):992-3. DOI: 10.1086/605539
- Prushinsky AP. Experience of implementing a healthcare-associated pathogens microbiological monitoring system in a multi-purpose children's hospital. MediAl'. 2018;2(22):16-20. (In Russian).
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011

13. Yarovoy SK, Voskanian ShL, Tutelyan AV, Gladkova LS. Role of active epidemiological surveillance in the detection of healthcare-associated infections. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2019;9(3):32-38. DOI: 10.18565/epidem.2019.9.3.32-8 (In Russian).

Информация о соавторах:

Некрасова Татьяна Маркеловна, врач-бактериолог бактериологической лаборатории отдела обеспечения лабораторной деятельности ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае»

Боталова Наталья Игоревна, специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Пермскому краю

Лукьянцева Светлана Альбертовна, заведующая бактериологической лабораторией, врач-бактериолог отдела обеспечения лабораторной деятельности ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае»

Карпунина Тамара Исаковна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера»

Information about co-authors:

Tatyana M. Nekrasova, bacteriologist of the bacteriological laboratory of the department of laboratory activities support of the Federal Budgetary Institution of Health "Center for Hygiene and Epidemiology in Perm Krai"

Natalia I. Botalova, specialist-expert of the epidemiological surveillance department of the Office of Rosпотребнадзор in Perm Krai

Svetlana A. Lukyantseva, head of the bacteriological laboratory, bacteriologist of the department of laboratory activities support of the Federal Budgetary Institution of Health "Center for Hygiene and Epidemiology in Perm Krai"

Tamara I. Karpunina, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor of the Department of Microbiology and Virology of the FSBEI HE "Academician E.A.Wagner Perm State Medical University"

НОВОСТИ НАУКИ

Потенциальный прорыв в борьбе с устойчивостью к антибиотикам из исторического соляного раствора

Соляной раствор в английском рыночном городе Дройтвич-Спа в Вустершире известен своим высоким содержанием соли. Исследователи обнаружили уникальную микробную жизнь, обитающую в рассоле города, и поняли, что это идеальная среда для изучения микробов, адаптированных к соли, с потенциальным медицинским применением.

Это исследование дало важные результаты, включая данные секвенирования ДНК, раскрывающие микробную жизнь в рассоле, и изолированные организмы, способные подавлять MRSA и другие патогены.

Устойчивость к антибиотикам, глобальный кризис здравоохранения наравне с изменением климата, представляет серьезную угрозу для лечения. Поскольку распространенные инфекции становится все труднее лечить из-за резистентных бактерий, открытие новых антибиотиков стало критически важным.

Открытие микробов, способных подавлять рост MRSA, – это захватывающий шаг вперед. Он подчеркивает неиспользованный потенциал соляных рассолов Дройтвич-Спа в борьбе с устойчивостью к антибиотикам.

В марте 2024 года доктор Мара Лейте, руководитель проекта в ОУ, выделила из соляного раствора три штамма микробов, адаптированных к соли.

Примечательно, что эти штаммы смогли подавить рост различных патогенов, связанных с больницей, включая MRSA. Лабораторные тесты показывают, что MRSA уничтожается этими «хорошими» микробами, что подчеркивает их потенциал для производства новых антибиотиков.

Результаты показывают, что изучение микробного разнообразия экстремальных сред действительно является многообещающим подходом к обнаружению антимикробных соединений. Суровые условия этих сред могут стимулировать эволюцию уникальных антибиотиков, которые еще предстоит идентифицировать.

Исследовательская группа сейчас сосредоточена на выявлении конкретных генов и химических веществ, ответственных за эту антибактериальную активность. Хотя еще многое предстоит сделать, эти ранние результаты показывают, что рассол Дройтвич-Спа может сыграть ключевую роль в разработке новых мощных антибиотиков для борьбы с устойчивыми инфекциями.

*«Potential breakthrough in battle against antibiotic resistance from historic brine». Просмотрено: 24 сентября 2024 г.
Available at: <https://phys.org/news/2024-09-potential-breakthrough-antibiotic-resistance-historic.html>*

Анализ санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан

Л.Ф.Гафарова^{1,2}, М.А.Харитоновна², Г.Г.Бадамшина^{1,3}, Е.П.Сизова¹, Л.В.Ставропольская¹, О.Н.Ильинская²

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация;

²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация

В работе проведен анализ санитарно-бактериологического состояния местных и привозных лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан в период с 2017 по 2023 г. Установлено, что наиболее соответствующими требованиям нормативно-методических документов являются грязи сульфидно-илового типа Республики Крым и Ставропольского края. Показано, что суммарный удельный вес проб с превышением нормативных уровней санитарно-показательных и потенциально патогенных бактерий снижался на протяжении исследуемого периода. Однако было зафиксировано наличие ряда проб, не соответствующих нормативным уровням по общей бактериальной загрязненности, а также по показателям контаминации синегнойной палочкой. С целью предотвращения возникновения инфекционных заболеваний и повышения уровня безопасности процедур грязелечения в условиях санаториев Республики Татарстан рекомендовано повысить эффективность регенерации грязей методом активации.

Ключевые слова: лечебные грязи, пелоиды, пелоидотерапия, санатории, санитарно-бактериологический анализ, *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

Для цитирования: Гафарова Л.Ф., Харитоновна М.А., Бадамшина Г.Г., Сизова Е.П., Ставропольская Л.В., Ильинская О.Н. Анализ санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан. Бактериология. 2024; 9(3): 62–69. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-62-69

Analysis of the sanitary and bacteriological state of therapeutic mud used in sanatoriums of the Republic of Tatarstan

L.F.Gafarova^{1,2}, M.A.Kharitonova², G.G.Badamshina^{1,3}, E.P.Sizova¹, L.V.Stavropolskaya¹, O.N.Ilyinskaya²

¹Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation;

²Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation;

³Kazan State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

In this work was analyzed the sanitary and bacteriological state of local and imported medicinal mud used in sanatoriums of the Republic of Tatarstan in the period from 2017 to 2023. It has been established that the most compliant with the requirements of regulatory and methodological documents are the sulfide-silt type muds of the Republic of Crimea and the Stavropol Territory. It was shown that the total proportion of samples exceeding standard levels of sanitary-indicative and potentially pathogenic bacteria decreased throughout the study period. However, the presence of a number of samples was recorded that did not meet the standards for general bacterial contamination, as well as for contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. In order to prevent the occurrence of infectious diseases and increase the level of safety of mud therapy procedures in sanatoriums of the Republic of Tatarstan, it is recommended to increase the efficiency of mud regeneration using the activation method.

Key words: therapeutic mud, peloids, pelotherapy, sanatorium, sanitary-bacteriological analysis, *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

For citation: Gafarova L.F., Kharitonova M.A., Badamshina G.G., Sizova E.P., Stavropolskaya L.V., Ilyinskaya O.N. Analysis of the sanitary and bacteriological state of therapeutic mud used in sanatoriums of the Republic of Tatarstan. Bacteriology. 2024; 9(3): 62–69. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-62-69

Для корреспонденции:

Гафарова Ляйсан Фаридовна, заведующая лабораторией бактериологических исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» Роспотребнадзора, аспирант кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

Адрес: 420061, Казань, ул. Сеченова, 13А
Телефон: (843) 221-7915

Статья поступила 18.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Laysan F. Gafarova, Head of the Laboratory of Bacteriological Research, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan of Rosпотребнадзор, Phd student of the Department of Microbiology, «Kazan (Volga Region) Federal University» of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Address: 13A Sechenov str., Kazan, 420061, Russian Federation
Phone: (843) 221-7915

The article was received 18.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

На сегодняшний день лечебные грязи (пелоиды) широко применяются в медицине с профилактической и терапевтической целью, кроме того, грязелечение входит в программы реабилитации опорно-двигательного аппарата обычных пациентов и спортсменов. Лечебные грязи различной природы (сульфидно-иловые, торфяные, сапропелевые, сопочные) оказывают разносторонние лечебные эффекты: обезболивающий, хондропротекторный, стимулирующий, противовоспалительный, противоотечный, репаративно-регенераторный, метаболический, иммуномодулирующий, дефибрирующий, антиоксидантный, адсорбционно-резорбтивный, дезтоксикационный, десенсибилизирующий и др. [1–3].

На территории Республики Татарстан функционирует более 10 санаториев, использующих в своей практической деятельности грязелечение с применением местных или привозных грязей различной природы. Специфика использования лечебных грязей (аппликации на поверхности кожи, раневые поверхности, слизистые оболочки), требует строгого контроля и гарантий эпидемической безопасности. Вместе с тем исследования, посвященные комплексному изучению санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Татарстана, в открытых источниках представлены в недостаточной мере. Опубликованы микробиологические характеристики лишь отдельных месторождений. Так, данные литературы свидетельствуют о том, что лечебные грязи из месторождений Республики Крым (Сакское озеро, озеро Аджиголь) и Ставропольского края (озеро Тамбукан) характеризуются достаточно устойчивыми, не превышающими нормативов, санитарно-микробиологическими показателями [4–6]. Проведенный нами анализ санитарно-бактериологических показателей сакской лечебной грязи подтвердил ее гигиеническую безопасность [7]. Залежи лечебной грязи озера Тамбукан отличаются бактериальной чистотой: коли-титр, титр перфрингенс, титр кокковой микрофлоры находятся в пределах нормы, синегнойная палочка не обнаружена [4]. Н.В.Ефименко с соавт. было описано бактериостатическое и бактерицидное действие грязи озера Тамбукан [8]. Однако вода озера Тамбукан является бактериально чистой не во всех точках отбора. Е.Г.Потаповым было показано, что вода родников у горы Золотой Курган, реки Этоки, ручьев у западного берега озера загрязнена кишечной палочкой, в ней обнаружива-

лись стафилококки и стрептококки [4]. В.А.Хохлов отмечает нормальное состояние рапы Сакского озера в лечебных бассейнах по санитарно-бактериологическим показателям (титр лактозоположительных кишечных палочек (ЛКП), *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* и индекс *Staphylococcus aureus*), но подчеркивает, что в летние месяцы возможно превышение нормативных показателей по общему микробному числу [6].

Местные лечебные грязи Татарстана относятся к трем различным типам (сапропелевые, иловые, торфяные), имеют различные гидрогеологические условия образования и обладают собственной специфичной микробиотой (табл. 1) [9].

Цель настоящей работы состояла в проведении сравнительного комплексного анализа санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан.

Материалы и методы

Пробы лечебных грязей поступали для анализа с 2017 по 2023 г. из 14 санаториев Республики Татарстан (АО Санаторий «Крутушка», Лечебно-профилактическое частное учреждение профсоюзов санаторий «Бакирово», Учреждение профсоюзов санаторий «Шифалы Су-Ижминводы», Первичная организация профсоюза работников здравоохранения РФ лечебно-профилактического частного учреждения профсоюзов санаторий «Жемчужина», Лечебно-профилактическое частное учреждение профсоюзов санаторий «Ливадия», Лечебно-профилактическое частное учреждение профсоюзов санаторий «Васильевский», ОАО «Татэнерго» санаторий «Балкыш», ООО Санаторий «Сосновый бор», ООО Клиника-санаторий «Набережные Челны», Санаторий-профилакторий «Лениногорский» УСО ПАО «Татнефть», Санаторий-профилакторий «Ромашкино» УСО ПАО ТН им. В.Д.Шашина, Республиканский центр реабилитации МЧС РТ им. Каратая, Санаторий-профилакторий «Казаньоргсинтез» МСЧ ПАО «Казаньоргсинтез», Частное учреждение профсоюзов «Минресурскурорт»). Типы применяемых лечебных грязей представлены в табл. 1.

Исследования проводились в рамках реализации программ производственного контроля, регламентированных СП 1.1.1058-01 [10], на базе бактериологических лабораторий ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике

Таблица 1. Характеристика лечебных грязей, поступивших из санаториев Республики Татарстан для анализа санитарно-бактериологического состояния

Table 1. Characteristics of therapeutic mud received from sanatoriums of the Tatarstan Republic for the analysis of sanitary-bacteriological state

№	Типы грязей / Types of mud	Месторождения лечебных грязей / Deposits of therapeutic mud	Регионы происхождения лечебных грязей / Regions of origin of medicinal mud
1	Иловая / Silt	Озеро Голубое / Lake Goluboe	Республика Татарстан / Republic of Tatarstan
2	Сапропелевая / Sapropelic	Территория санатория / Territory of the sanatorium	Республика Татарстан / Republic of Tatarstan
3	Торфяная / Peat	«Таборли-3» на пойменной террасе р. Чаж / "Taborli-3", the floodplain terrace of the Chazh River	Республика Татарстан / Republic of Tatarstan
4	Сульфидная иловая / Sulfide silt	Сакское озеро / Saki Lake	Республика Крым / Republic of Crimea
5	Сульфидная иловая / Sulfide silt	Озеро Тамбукан / Lake Tambukan	Ставропольский край / Stavropol region
6	Сапропелевая / Sapropelic	Озеро Карасевое / Lake Karasevoya	Томская область / Tomsk region
7	Сапропелевая / Sapropelic	Озеро Молтаево / Lake Moltaevo	Свердловская область / Sverdlovsk region

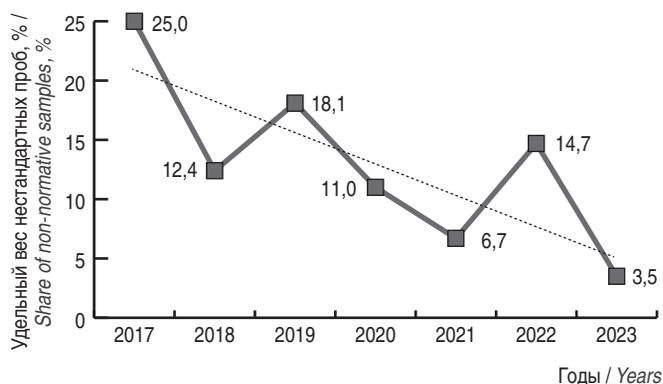


Рис. 1. Динамика изменения удельного веса нестандартных проб лечебной грязи, поступивших из санаториев Республики Татарстан в 2017–2023 гг.

Fig. 1. Dynamics of changes in the specific gravity of non-standart therapeutic mud samples received from sanatoriums of the Tatarstan Republic in 2017–2023.

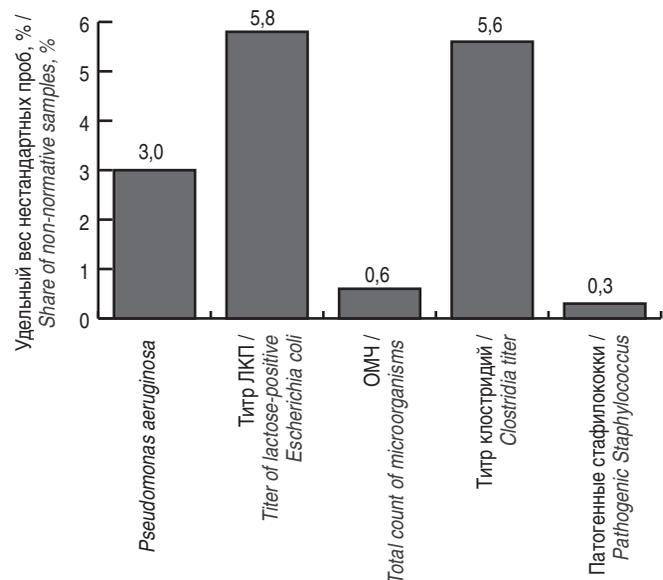


Рис. 2. Удельный вес нестандартных проб лечебных грязей, поступивших из санаториев Республики Татарстан в 2017–2023 гг.

Fig. 2. The specific gravity of non-standart therapeutic mud samples obtained from sanatoriums of the Republic of Tatarstan in 2017–2023

Татарстан» и его филиалов. Объекты исследований были обезличены, характеристики проб грязей (тип, месторождение и регион происхождения) были получены после завершения исследования в 2023 г. Всего было проанализировано 624 пробы.

Исследование проб проводили в соответствии с МУ №143-9/316-17 [11] сразу после поступления проб в лабораторию. Навеску грязи (15–30 г) помещали в колбу со стерильной водопроводной водой и встряхивали на шуттель-аппарате в течение 15–20 мин. В результате образовывалась «грязевая болтушка» с основным разведением грязи (1:10). Из основного разведения готовили десятикратные разведения и осуществляли посев на следующие питательные среды: мясопептонный агар; лактозопептонная среда Эйкмана для первичной идентификации энтеробактерий; среда Эндо для выделения и дифференциации грамотрицательных микроорганизмов кишечной группы; желточно-солевой агар для выяв-

ления солеустойчивых микроорганизмов, в т.ч. коагулазоположительных стафилококков; цетримидный агар для выявления синегнойной палочки. Все использованные среды произведены ФБУН ГНЦ ПМБ (г. Оболенск).

Нормативные уровни санитарно-микробиологических показателей качества лечебных грязей грязелечебниц следующие: общее микробное число (ОМЧ) – $5 \cdot 10^5$ клеток/г, титр ЛКП – 10, титр клостридий – 0,1, *P. aeruginosa* и патогенные стафилококки – отсутствие в 10 г. Превышение допустимых уровней обсемененности образцов по одному или более показателей характеризует пробу как не соответствующую требованиям методического документа (такие пробы были обозначены как «нестандартные»).

Статистическая обработка проведена с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office (V.360). Статистическая значимость ($p < 0,05$) определена на основе данных анализа произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 .

Результаты исследования

Установлено, что за период с 2017 по 2023 г. средний удельный вес проб, не соответствующих по санитарно-бактериологическим показателям требованиям действующих нормативно-методических документов, составил 11,9%. Максимальный уровень нестандартных проб лечебных грязей был зафиксирован в 2017 г. (25,0%), минимальный – в 2023 г. (3,5%) (рис. 1).

Анализ динамики нестандартных проб лечебных грязей за исследуемый период выявил тенденцию к снижению удельного веса проб, не соответствующих требованиям нормативно-методических документов, по одному или нескольким показателям.

Лечебные грязи, поступавшие из санаториев Татарстана, не всегда соответствовали требованиям МУ №143-9/316-17. Из общего количества проанализированных проб (624) требованиям не соответствовали по титру ЛКП – 36 проб, титру клостридий – 35, по показателю *P. aeruginosa* – 19, реже по ОМЧ (4 пробы) и патогенным стафилококкам (2 пробы). Процентное соотношение нестандартных проб представлено на рис. 2.

Следует отметить, что 2,4% нестандартных проб не соответствовали нормативам по двум и более показателям (по титру ЛКП и клостридий – 1,3%, по титру клостридий и ОМЧ – 1,1%).

Несмотря на наличие общей тенденции к снижению доли нестандартных проб за период 2017–2023 гг., по ряду показателей наблюдался рост уровня контаминации лечебных грязей. Так, в общем количестве нестандартных проб частота выявления *P. aeruginosa* увеличивалась (рис. 3А), существенное превышение ОМЧ наблюдалось в 2020 и 2022 г. (рис. 3В).

По показателям титра ЛКП и титра клостридий была отмечена тенденция к снижению доли нестандартных проб (рис. 3Б и 3Г соответственно). Выявление патогенного стафилококка в пробах лечебных грязей носило эпизодический характер (рис. 3Д).

Анализ распределения проб лечебных грязей, поступающих из санаториев Республики Татарстан, по типам показал

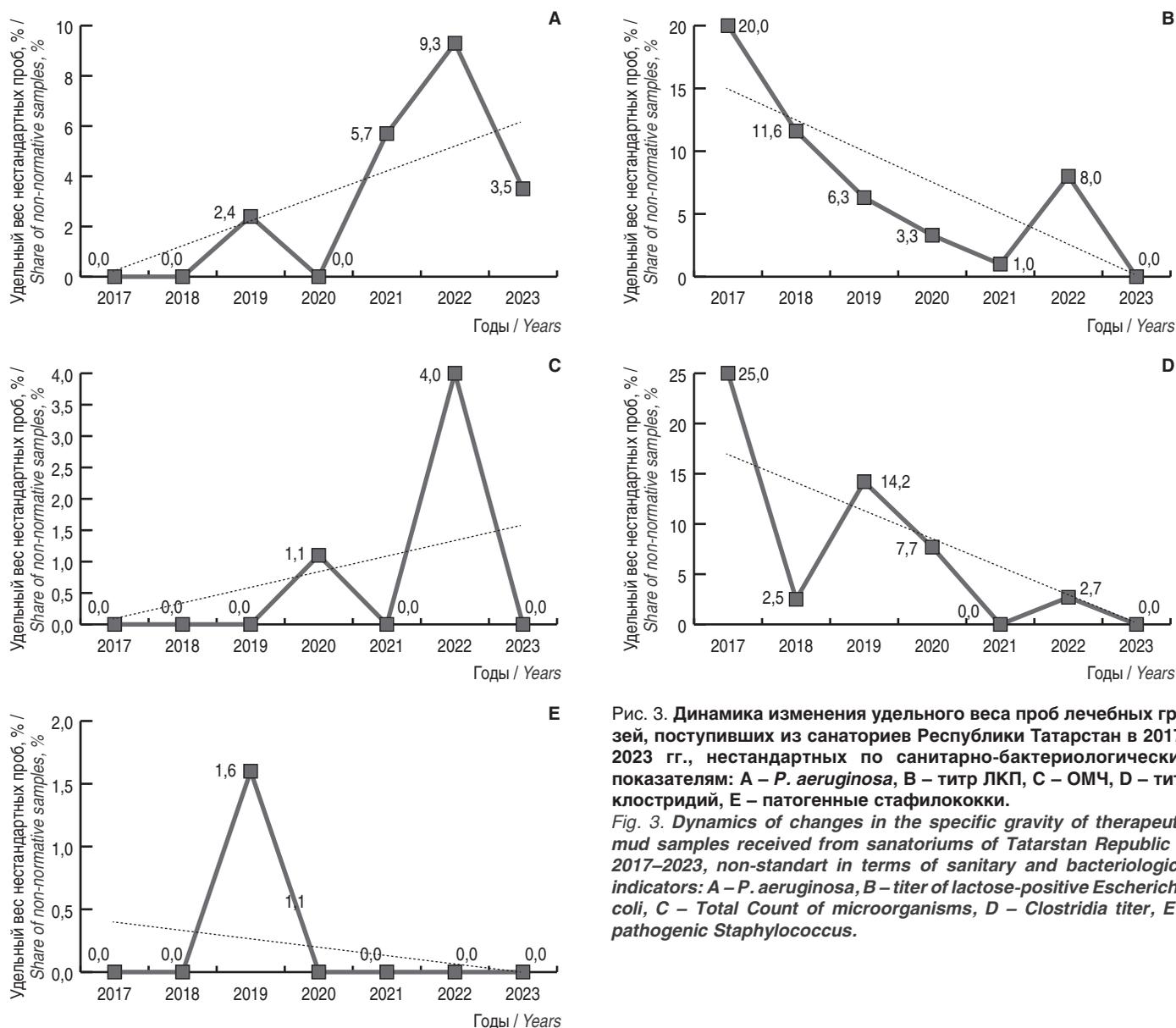


Рис. 3. Динамика изменения удельного веса проб лечебных грязей, поступивших из санаториев Республики Татарстан в 2017–2023 гг., нестандартных по санитарно-бактериологическим показателям: А – *P. aeruginosa*, В – титр ЛКП, С – ОМЧ, D – титр клостридий, E – патогенные стафилококки.
 Fig. 3. Dynamics of changes in the specific gravity of therapeutic mud samples received from sanatoriums of Tatarstan Republic in 2017–2023, non-standard in terms of sanitary and bacteriological indicators: A – *P. aeruginosa*, B – titer of lactose-positive *Escherichia coli*, C – Total Count of microorganisms, D – Clostridia titer, E – pathogenic *Staphylococcus*.

(рис. 4), что в исследуемый период наибольшее количество проб приходилось на сапропелевые (45%) и сульфидные иловые (42%) грязи, меньшее – на торфяные грязи (11%), иловые грязи применялись редко (2%).

В табл. 2 представлено сравнение удельного веса нестандартных проб в различных типах грязей. Установлено, что распределение нестандартных проб по типам лечебной грязи и общая контаминация пелоидов микроорганизмами (ОМЧ) статистически значимо не различались. Вместе с тем пробы с превышенным допустимым уровнем по показателям *P. aeruginosa*, титра ЛКП и титра клостридий обнаруживались статистически значимо чаще в торфяных и сапропелевых грязях ($p < 0,05$) по сравнению с сульфидными иловыми грязями, которые представляют собой высокоминеральные образования с преобладанием сульфида железа – гидротриодлита $[Fe (HS)_2]$, составляющего до 0,5% всей массы грязи. Высокая минерализация и наличие сероводорода отчасти препятствуют пролиферации исследуемых бактерий.

В рамках данного исследования были изучены 263 пробы местных лечебных грязей месторождений Республики

Татарстан (42,1% от общего количества проб), которые относятся к трем различным типам (сапропелевые, иловые, торфяные). В местных лечебных грязях были выявлены несоответствия требованиям нормативно-методического документа (табл. 3). Так, титр клостридий был превышен в 20 пробах, титр ЛКП – в 14, *P. aeruginosa* – в 11, реже наблюдалось превышение ОМЧ – 3 пробы; патогенные стафилококки были обнаружены в 1 пробе.

Обсуждение

Анализ санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан, выявил средний удельный вес нестандартных проб с превышением нормативных уровней санитарно-микробиологических показателей (11,9%). Бактериальное загрязнение исследуемых пелоидов может происходить в результате антропогенного воздействия на месторождения лечебных грязей (например, бытовые стоки), вследствие их контаминации в процессе подготовки лечебных грязей в ус-

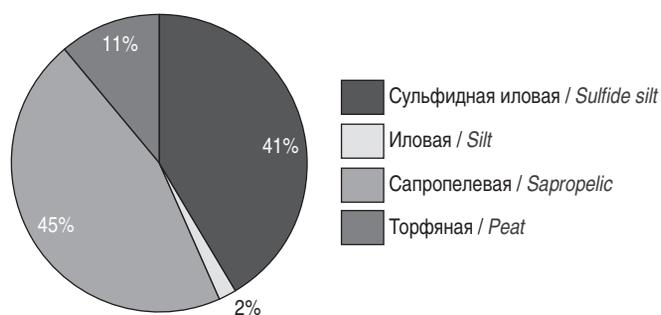


Рис. 4. Распределение проб лечебных грязей, поступивших из санаториев Республики Татарстан в 2017–2023 гг. по типам.
 Fig. 4. Distribution of therapeutic mud samples received from sanatoriums of the Tatarstan Republic in 2017–2023 by type.

ловиях санаториев, а также из-за незавершенности процессов пассивной регенерации [12]. Известно, что пелоиды обладают потенциалом к регенерации и самоочищению благодаря антимикробному действию автохтонной микрофлоры в условиях изоляции от источника загрязнения. Пассивная регенерация – это процесс, который позволяет безопасно повторно применить лечебную грязь, увеличить кратность использования ее для лечебных процедур, сократить объемы изъятия грязи из месторождений и при этом значительно уменьшить площади грязехранилищ [3, 13]. Нормализация санитарно-бактериологических показателей служит свидетельством окончания процесса регенерации [12, 13].

Вероятность контаминации лечебной грязи потенциально патогенной микрофлорой в результате переноса с кожи па-

циентов и вторичного использования пелоидов достаточно высока. Кроме того, возможен занос возбудителей нозокомиальных инфекций через контаминированное оборудование или материалы. Существуют данные, подтверждающие появление в лечебной грязи чужеродной микрофлоры – стрептококков, стафилококков, синегнойной, столбнячной, кишечной, тифозной палочек [3, 14].

Обнаружение в исследуемых пробах лечебных грязей таких значимых возбудителей нозокомиальных инфекций, как *P. aeruginosa* (3,0% проб) и *S. aureus* (0,3%) свидетельствует о высокой эпидемической опасности. Использование данных грязей может привести к развитию гнойно-септических инфекций у пациентов [15–17], а также к возникновению новых госпитальных штаммов с повышенной вирулентностью.

Пробы исследуемых грязей, которые не соответствовали нормативам по титру клостридий (5,6% проб) и титру ЛКП (5,8%), свидетельствуют о возможности свежего фекального загрязнения. Они являются потенциальным источником возбудителей анаэробных клостридиальных инфекций, в т.ч. резистентных токсигенных штаммов *C. difficile*, для которых в последние годы отмечен рост глобальных показателей заболеваемости в большинстве регионов мира [17, 18]. Высокий титр ЛКП свидетельствует о риске инфицирования вирулентными штаммами *Escherichia coli*, вызывающими острые кишечные расстройства [16, 17]. При превышении нормативных уровней основных санитарно-микробиологических показателей рекомендуется проводить дополнительные исследования на наличие показателей свежего фекаль-

Таблица 2. Среднемноголетний удельный вес нестандартных проб лечебных грязей, поступивших из санаториев Республики Татарстан в 2017–2023 гг.

Table 2. The long-term average share of non-standard samples of therapeutic mud received from sanatoriums of the Tatarstan Republic in 2017–2023

Типы грязей / Types of mud	Количество проб / Number of samples	Удельный вес нестандартных проб, % / Share of non-standard samples, %	Удельный вес нестандартных проб по показателям, % / Share of non-standard samples by indicators, %				
			<i>P. aeruginosa</i>	Титр ЛКП / Titer of lactose-positive <i>E. coli</i>	ОМЧ / Total count of microorganisms	Титр клостридий / Clostridia titer	Патогенные стафилококки / Pathogenic <i>Staphylococcus</i>
Иловая / Silt	12	8,3	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0
Сапропелевая / Sapropelic	250	17,6	4,4	6,4	1,2	9,6	0,4
Торфяная / Peat	61	13,1	6,6	6,6	0,0	3,3	0,0
Сульфидная иловая / Sulfide silt	228	4,8	1,8	2,2	0,4	1,8	0,4

Таблица 3. Среднемноголетний удельный вес нестандартных проб местных лечебных грязей, поступивших из санаториев Республики Татарстан в 2017–2023 гг.

Table 3. The long-term average share of non-standard samples of local therapeutic mud received from sanatoriums of the Tatarstan Republic in 2017–2023

Объект / Object	Количество проб / Number of samples	Общее количество нестандартных проб* / Total number of non-standard samples *	Количество нестандартных проб по показателям* / Number of non-standard samples by indicator*				
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Титр ЛКП / Titer of lactose-positive <i>E. coli</i>	ОМЧ / Total Count of microorganisms	Титр клостридий / Clostridia titer	Патогенные стафилококки / Pathogenic <i>Staphylococcus</i>
№1	12	1 (8,3)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
№2	190	30 (15,8)	7 (3,7)	9 (4,7)	3 (1,6)	18 (9,5)	1 (0,5)
№3	61	8 (13,1)	4 (6,6)	4 (6,6)	0 (0)	2 (3,3)	0 (0)
Всего / Total	263	39 (14,8)	11 (4,2)	14 (5,3)	3 (1,1)	20 (7,6)	1 (0,4)

* абсолютное значение (удельный вес, %) / absolute value (specific gravity, %).

ного загрязнения (энтерококков, фекальных колиформных бактерий). Кроме того, с целью поиска потенциальных источников инфекции и профилактики инфекционных заболеваний требуется проведение дальнейшей идентификации микроорганизмов до вида, определение патогенных серотипов, а также анализ антибиотикорезистентности изолятов.

В результате анализа санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, применяемых в санаториях Республики Татарстан, установлено, что привозные сульфидные иловые грязи республики Крым и Ставропольского края характеризуются наименьшим удельным весом нестандартных проб по санитарно-бактериологическим показателям (4,8%), несмотря на наличие этапа транспортировки из удаленных регионов страны. Бактериостатическое и бактерицидное действие грязи озера Тамбукан [8] способствует поддержанию эпидемической безопасности грязи и ее быстрой регенерации, что имеет особенное значение для лечебного наружного и полостного применения.

Уровень удельного веса проб местных грязей, нестандартных по санитарно-бактериологическим показателям (14,8%), вероятно, обусловлен отбором проб на различных стадиях процесса регенерации лечебных грязей в рамках программы производственного контроля. Если для регенерации иловых сульфидных грязей достаточно 3–6 мес., то для торфяных грязей этот период увеличивается до 1,5 лет. Очевидно, что обеспечение полной регенерации используемых грязей в естественных условиях труднодостижимо, поэтому важно проводить анализ динамики изменения санитарных показателей и применять методы ускоренной регенерации.

Корректность сравнительного анализа грязей может быть усилена анализом такого компонента, как кероген, представляющего собой рассеянное органическое вещество осадочных пород низких стадий преобразования, нерастворимое в органических растворителях. Различают сапропелевый, гумусовый и смешанные виды керогена. Элементный состав керогена для пород сапропелевого типа (%): С (64–93); Н (6–10); О (0–25); N (0,1–4,0); S (0,1–8,0); для гумусового-сапропелевого типа – С (64–96); Н (1–5); О (3–25); N (0,1–2,0); S (0,1–3,0) [19]. Сапропелевый кероген по сравнению с гумусовым характеризуется повышенным содержанием водорода (Н/С: 1,7–0,3 и 1,0–0,3 соответственно) и низким содержанием кислорода (О/С: 0,1–0,02 и 0,4–0,02 соответственно). В процессе длительных преобразований пород уменьшается содержание керогена и изменяется его состав, что коррелирует с увеличением содержания углерода, снижением содержания водорода и других элементов, а следовательно, и с изменением состава микробных сообществ. Так, обнаружение керогена в сапропеле прибрежного озера Текиргюл позволяет предположить начальную стадию созревания осадочных пород [20].

Комплексных исследований, посвященных определению уровня зрелости и изучению санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей, в Российской Федерации не проводилось. В то же время ясно, что это имеет важное значение для определения завершенности процесса регенерации грязей как в природе, так и в грязехранилищах при санаториях, где должны быть обеспечены естественное освещение, приточно-вытяжная вентиляция и температура

в пределах +10...+15°C [21, 22]. Свежую, а также требующую регенерации отработанную лечебную грязь хранят в специальных бетонированных бассейнах с люками над ними в наружной стене для загрузки свежей грязи. Отработанная грязь загружается в бассейн и регенерируется в нем в течение 3–4 мес. Оптимальная толщина слоя лечебной грязи в бассейне – не более 1,2–1,5 м, высота слоя рапы над лечебной грязью – не менее 15 см. Поскольку частота отбора проб грязи из грязехранилищ для санитарно-бактериологического анализа не регламентирована, при анализе имеет место некоторый разброс показателей, что может быть связано с различиями в уровне зрелости грязи и завершенности этапов пассивной, либо активной регенерации грязей.

Тенденция к росту удельного веса проб лечебных грязей, нестандартных по общей бактериальной загрязненности, а также по показателям контаминации синегнойной палочкой, выявленная за период 2017–2023 гг., указывает как на растущую необходимость видовой идентификации выделенных потенциально патогенных микроорганизмов, так и на актуальность доработки программ производственного контроля и модификации применяемых методов регенерации грязей. Целесообразным является осуществление систематического контроля микробной контаминации пелоидов на протяжении всего процесса регенерации лечебных грязей. Данный подход позволит оценить полноту и эффективность процесса регенерации. Значимым является ускорение процессов регенерации лечебных грязей с участием автохтонной микрофлоры в результате температурной и механической активации. Так, было показано, что биохимические процессы при активации протекают на два порядка быстрее и это приводит к существенному обогащению лечебной грязи биологически активными веществами антимикробного действия [12]. Комплексный подход, включающий в себя совершенствование методов санитарного контроля и регенерации пелоидов позволит предотвратить возникновение инфекционных заболеваний и повысить безопасность проведения процедур грязелечения в условиях санаториев Республики Татарстан.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Aksanyar B, Yilmaz H, Karaarslan F, Yilmaz R, Karpuz S. Comparison of the effectiveness of peloid and paraffin treatment for symptomatic hand osteoarthritis in women: a single-blind randomized controlled study. *Int J Biometeorol.* 2022 Aug;66(9):1841–1851. DOI: 10.1007/s00484-022-02324-z
2. Maraver F, Armijo F, Fernandez-Toran MA, Armijo O, Ejeda JM, Vazquez I, et al. Peloids as Thermo-therapeutic Agents. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Feb 18;18(4):1965. DOI: 10.3390/ijerph18041965

- Baldovin T, Amoruso I, Caldara F, Buja A, Baldo V, Cocchio S, et al. Microbiological Hygiene Quality of Thermal Muds: A Pilot Study in Pelotherapy Facilities of the Euganean Thermal District (NE Italy). *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jul 13;17(14):5040. DOI: 10.3390/ijerph17145040
- Потапов ЕГ, Сибукбаев ЭШ. Современное состояние и проблемы Тамбуканского месторождения лечебной грязи. *Курортная медицина*. 2021;3:31-44.
- Позаченюк ЕА, Лукьянова МЮ. Проблемы эффективного использования естественных ресурсов лечебного озера Адзиголь. *Геополитика и экогеодинамика регионов*. 2013;9(1):20-27.
- Хохлов ВА. Природные лечебные ресурсы Сакского озера. *Вестник физиотерапии и курортологии*. 2017;23(3):84-87.
- Гафарова ЛФ, Колпаков АИ, Ильинская ОН. Характеристика бактериального сообщества сакской лечебной грязи, применяемой в санаториях Татарстана. *Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И.Вернадского. Биология. Химия*. 2023;9(4):26-35.
- Ефименко НВ, Меньшикова ТБ, Васин ВА, Глухов АН, Урвачева ЕЕ, Школьный ВН. Лечебные грязи озера Большой Тамбукан в медицинской реабилитации социально значимых заболеваний. *Курортная медицина*. 2015;2:89-94.
- Ильинская ОН, Гафарова ЛФ, Курди У, Колпаков АИ, Яковлева ГЮ. Микробиом лечебных грязей, применяемых в Татарстане. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2023;100(5):27-35.
- Санитарные правила СП 1.1.1058-01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», утвержденные Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 13.07.2001 №18.
- Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу лечебных грязей (утверждены Главным государственным санитарным врачом СССР 11 сентября 1989 г. №143-9/316-17).
- Ступникова НА. Преобразование лечебной грязи в процессах ее регенерации и активации. *Региональные проблемы*. 2007;8:155-158.
- Илли ЯР, Гончарова ЕН. Экологические аспекты регенерации сапропелевых грязей. Энерго – и ресурсосберегающие экологически чистые химико-технологические процессы защиты окружающей среды: Сборник докладов III Международной научно-технической конференции, Белгород, 14–15 ноября 2017 г. 2017;35-39.
- Борисенко ВВ. Экологическое состояние лечебной грязи оз. Утиное Паратунского курорта Камчатского края. Теория и практика современных гуманитарных и естественных наук: материалы ежегодной межрегиональной научно-практической конференции, Петропавловск-Камчатский, 11 февраля 2011 г. 2012;16-20.
- Козлова НС, Баранцевич НЕ, Баранцевич ЕП, Варгасова ВС. Спектр возбудителей госпитальных гнойно-септических инфекций. Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2017;12(2):602-603.
- Шаталова ЕВ, Парахина ОВ, Охотникова СА. Микробиологический мониторинг – важнейший компонент системы эпидемиологического надзора за нозокомиальными инфекциями. *Российский медицинский журнал*. 2016;22(5):247-249.
- Фролов ВК, Игнаткова АС, Куракин ЭС, Макарачев АИ. Микробиологическая характеристика и клинко-эпидемиологические особенности актуальных групп микроорганизмов-возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (обзор литературы). *Перспективы развития науки и образования: Сборник научных трудов по материалам XXX международной научно-практической конференции*. Москва, 29 июня 2018 г. 2018;243-283.
- Дзеранова НЯ, Зотов ДД, Исаков ВА, Вютрих ЕВ. Инфекция *Clostridium difficile*: актуальные подходы к диагностике и лечению. *University Therapeutic Journal*. 2023;5(1):85-96.
- Горная энциклопедия, сайт. Режим доступа: <http://www.mining-enc.ru/k/kerogen/> (дата обращения: 27.01.2024) Текст: электронный.
- Baricz A, Levei EA, Şenilâ M, Pinzaru SC, Aluâş M, Vulpoi A, et al. Comprehensive mineralogical and physicochemical characterization of recent sapropels from Romanian saline lakes for potential use in pelotherapy. *Sci Rep*. 2021 Sep 20;11(1):18633. DOI: 10.1038/s41598-021-97904-1
- ОСТ 42-21-16-86. Отраслевой стандарт. Система стандартов безопасности труда. Отделения, кабинеты физиотерапии. Общие требования безопасности (утв. и введен в действие Приказом Минздрава СССР от 04.11.1986 №1453).
- Приказ Минздрава России от 05.05.2016 №279н (ред. от 25.09.2020) «Об утверждении Порядка организации санаторно-курортного лечения» (Зарегистрировано в Минюсте России 21.06.2016 №42580).

References

- Aksanyar B, Yılmaz H, Karaarslan F, Yılmaz R, Karpuz S. Comparison of the effectiveness of peloid and paraffin treatment for symptomatic hand osteoarthritis in women: a single-blind randomized controlled study. *Int J Biometeorol*. 2022 Aug; 66(9):1841-1851. DOI: 10.1007/s00484-022-02324-z
- Maraver F, Armijo F, Fernandez-Toran MA, Armijo O, Ejeda JM, Vazquez I, et al. Peloids as Thermo-therapeutic Agents. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Feb 18;18(4):1965. DOI: 10.3390/ijerph18041965
- Baldovin T, Amoruso I, Caldara F, Buja A, Baldo V, Cocchio S, et al. Microbiological Hygiene Quality of Thermal Muds: A Pilot Study in Pelotherapy Facilities of the Euganean Thermal District (NE Italy). *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jul 13;17(14):5040. DOI: 10.3390/ijerph17145040
- Potapov EG, Sibukaev ES. Current state and problems of the Tambukan medicinal mud deposit. *Spa Medicine*. 2021;3:31-44. DOI 10.51871/2304-0343_2021_3_31 (In Russian).
- Pozachenyuk EA, Lukyanova MJ. Problems of effective use of natural resources of the healing lake Adzhigol. *Geopolitics and Ecogeodynamics of Regions*. 2013;9(1):20-27. (In Russian).
- Khokhlov VA. Natural healing resources of Lake Saki. *Bulletin of Physiotherapy and Balneology*. 2017;23(3):84-87. (In Russian).
- Gafarova LF, Kolpakov AI, Ilyinskaya ON. Characteristics of the bacterial community of Saki medicinal mud used in sanatoriums of Tatarstan. *Scientific Notes of the V.I.Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*. 2023;9(4):26-35. (In Russian).
- Efimenko NV, Menshikova TB, Vasin VA, Glukhov AN, Urvacheva EE, Shkolnyi AN. Therapeutic mud of Lake Bolshoi Tambukan in the medical rehabilitation of socially significant diseases. *Spa Medicine*. 2015;2:89-94. (In Russian).
- Ilyinskaya ON, Gafarova LF, Kurdi U, Kolpakov AI, Yakovleva GYu. Microbiome of medicinal mud used in Tatarstan. *Issues of Balneology, Physiotherapy and Therapeutic Physical Culture*. 2023;100(5):27-35. DOI: 10.17116/kurort202310005127 (In Russian).
- Sanitary rules SP 1.1.1058-01 «Organization and conduct of production control over compliance with sanitary rules and implementation of sanitary and anti-epidemic (preventive) measures», approved by Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated July 13, 2001 No 18. (In Russian).
- Guidelines for sanitary and microbiological analysis of medicinal mud (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the USSR on September 11, 1989 No 143-9/316-17). (In Russian).
- Stupnikova NA. Transformation of therapeutic mud in the processes of its regeneration and activation. *Regional Problems*. 2007;8:155-158. (In Russian).
- Illy YaR, Goncharova EH. Ecological aspects of sapropel mud regeneration. Energy – and resource-saving environmentally friendly chemical-technological processes for environmental protection: Collection of reports of the III International Scientific and Technical Conference, Belgorod, November 14–15, 2017. 2017;35-39. (In Russian).
- Borisenko VV. Ecological state of the healing mud of the lake. Duck in the Paratunsky resort of the Kamchatka Territory. *Theory and practice of modern*

- humanities and natural sciences: materials of the annual interregional scientific and practical conference, Petropavlovsk-Kamchatsky, February 11, 2011. 2012;16-20. (In Russian).
15. Kozlova NS, Barantsevich NE, Barantsevich EP, Vargasova VS. Spectrum of pathogens of hospital purulent-septic infections. *Health is the Basis of Human Potential: Problems and Ways to Solve them.* 2017;12(2):602-603. (In Russian).
 16. Shatalova EV, Parakhina OV, Okhotnikova SA. Microbiological monitoring is an essential component of the epidemiological surveillance system for nosocomial infections. *Russian Medical Journal.* 2016;22(5):247-249. DOI: 10.18821/0869-2106-2016-22-5-247-249 (In Russian).
 17. Frolov VK, Ignatkova AS, Kurakin ES, Makarchev AI. Microbiological characteristics and clinical and epidemiological features of current groups of microorganisms that cause infections associated with the provision of medical care (literature review). Prospects for the development of science and education: Collection of scientific papers based on the materials of the XXX International Scientific and Practical Conference, Moscow, June 29, 2018. 2018;243-283. (In Russian).
 18. Dzeranova NY, Zotov DD, Isakov VA, Wuthrich EV. *Clostridium difficile* infection: current approaches to diagnosis and treatment. *University Therapeutic Journal.* 2023;5(1):85-96. DOI: 10.56871/UTJ.2023.40.38.005 (In Russian).
 19. Mountain encyclopedia, website. Available at: <http://www.mining-enc.ru/k/kerogen/> (accessed 27 January 2024). Text: electronic (in Russian).
 20. Baricz A, Levei EA, Şenilâ M, Pînzaru SC, Aluâş M, Vulpoi A, et al. Comprehensive mineralogical and physicochemical characterization of recent sapropels from Romanian saline lakes for potential use in pelotherapy. *Sci Rep.* 2021 Sep 20;11(1):18633. DOI: 10.1038/s41598-021-97904-1
 21. OST 42-21-16-86. Industry standard. System of occupational safety standards. Departments, physiotherapy rooms. General safety requirements (approved and put into effect by Order of the USSR Ministry of Health dated November 4, 1986 No 1453). (In Russian).
 22. Order of the Ministry of Health of Russia dated May 5, 2016 No 279n (as amended on September 25, 2020) «On approval of the Procedure for organizing sanatorium and resort treatment» (Registered with the Ministry of Justice of Russia on June 21, 2016 No 42580). (In Russian).

Информация о соавторах:

Харитоновая Майя Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

Бадамшина Гульнара Галимяновна, доктор медицинских наук, заведующая отделом микробиологических исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» Роспотребнадзора, доцент кафедры гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Сизова Елена Петровна, главный врач ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» Роспотребнадзора

Ставропольская Лидия Валерьевна, кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по обеспечению деятельности испытательного лабораторного центра ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» Роспотребнадзора

Ильинская Ольга Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

Information about co-authors:

Maya A. Kharitonova, PhD of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Kazan (Volga Region) Federal University

Gulnara G. Badamshina, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Microbiological Research, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan of Rosпотребнадзор, Associate Professor of the Department of Hygiene and Occupational Medicine «Kazan State Medical University» of Ministry of Health of the Russian Federation

Elena P. Sizova, Head Physician of the Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan of Rosпотребнадзор

Lidiya V. Stavropolskaya, PhD, MD, Deputy Head Physician for ensuring the activities of the testing laboratory center of the Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan of Rosпотребнадзор

Olga N. Ilyinskaya, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Head of the Department of Microbiology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Kazan (Volga Region) Federal University"

НОВОСТИ НАУКИ

Эффективное редактирование генома

CRISPR-Cas широко используется в исследованиях и медицине для редактирования, вставки, удаления или регулирования генов в организмах. TnpV является предком этих известных «генных ножниц», но он намного меньше и, следовательно, его легче транспортировать в клетки. Используя белковую инженерию и алгоритмы искусственного интеллекта, исследователи теперь расширили возможности TnpV, чтобы сделать редактирование ДНК более эффективным и универсальным, прокладывая путь к лечению генетического дефекта высокого уровня холестерина в будущем.

Кодируемые транспозоном (IS200/IS605) белки TnpV являются предшественниками эффекторов CRISPR класса 2 типа V и оказались одними из самых компактных редакторов генома, идентифицированных на сегодняшний день. В данной работе оптимизировали дизайн *Deinococcus radiodurans* (ISDra2) TnpV для применения в клетках млекопитающих (TnpVmax), что привело к среднему 4,4-кратному улучшению редактирования. Кроме того, разработаны варианты, мутировавшие в позиции K76, которые распознают альтернативные мотивы, смежные с мишенью (TAM), расширяя диапазон нацеливания ISDra2 TnpV. Также сгенерирован обширный набор данных по эффективности редактирования TnpVmax в 10 211 целевых сайтах. Это позволило определить правила для редактирования на целевом и вне целевого назначения и разработать модель глубокого обучения, названную предиктором эффективности редактирования TnpV (TEEP; <https://www.tnpb.app>), способную предсказывать активность направляющей РНК ISDra2 TnpV (ω RNA) с высокой эффективностью ($r > 0,8$). Используя TEEP, мы достигли эффективности редактирования до 75,3% в мышечной печени и 65,9% в мышечном мозге после доставки вектора аденоассоциированного вируса (AAV) TnpVmax. В целом, набор инструментов, представленных в этом исследовании, облегчает применение TnpV в качестве сверхкомпактной программируемой эндонуклеазы в исследованиях и терапии.

Marquart KF, Mathis N, Mollaysa A, Müller S, Kissling L, Rothgangl T, et al.
Effective genome editing with an enhanced ISDra2 TnpB system and deep learning-predicted ω RNAs.
Nat Methods. 2024 Sep 23. DOI: 10.1038/s41592-024-02418-z

Характеристика генов факторов патогенности и оценка цитотоксической активности штаммов *Vibrio vulnificus in vitro*

О.А.Цырулина, С.Ю.Темякова, В.В.Евдокимова, Л.П.Алексеева, О.С.Чемисова

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

Vibrio vulnificus – галофильный микроорганизм, вызывающий оппортунистические инфекции, проявляющиеся серьезными поражениями кожи и молниеносной септициемией у людей. Основными факторами патогенности *V. vulnificus* являются порообразующий холестерин-зависимый цитолизин VVH (*V. vulnificus* hemolysin) и высокомолекулярный цитотоксин MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin). Молекула MARTX содержит ряд активных доменов, необходимых для проявления биологической активности. Цель данной работы – провести генетическое скрининговое тестирование детерминант патогенного потенциала штаммов *V. vulnificus* и оценить их цитотоксичность на модели перевиваемых клеточных линий. Анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что все штаммы обладали генами *vvhA* и *rtxA1*, однако отличались по содержанию варибельных эффекторных доменов. Показано, что оптимальной моделью для оценки цитотоксической активности штаммов *V. vulnificus in vitro* является культура клеток HeLa (клетки карциномы шейки матки человека). Установлено, что отсутствие одного из эффекторных доменов может снизить цитотоксичность *V. vulnificus*. При этом только при наличии доменов RRSP (специфической эндопептидазы) и RID (инактивирующий гуанозинтрифосфатазу) у исследуемых штаммов наблюдался необратимый цитотоксический эффект на культуре клеток, что, вероятно, свидетельствует об их ключевой роли в реализации биологической активности.

Ключевые слова: *Vibrio vulnificus*, факторы вирулентности, цитолизин, MARTX, культура клеток, эффекторные домены

Для цитирования: Цырулина О.А., Темякова С.Ю., Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Чемисова О.С. Характеристика генов факторов патогенности и оценка цитотоксической активности штаммов *Vibrio vulnificus in vitro*. Бактериология. 2024; 9(3): 70–76. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-70-76

Characterization of genes of pathogenicity factors and assessment of cytotoxic activity of *Vibrio vulnificus in vitro*

O.A.Tsyurulina, S.Yu.Temyakova, V.V.Evdokimova, L.P.Alekseeva, O.S.Chemisova

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

Vibrio vulnificus is a halophilic microorganism that causes opportunistic infections resulting in severe skin lesions and fulminant septicemia in humans. The main pathogenicity factors of *V. vulnificus* are the pore-forming cholesterol-dependent cytolysin VVH (*V. vulnificus* hemolysin) and the high molecular weight cytotoxin MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin). The MARTX molecule contains a number of active domains necessary for the manifestation of biological activity. The purpose of this work is to conduct genetic screening testing of the determinants of the pathogenic potential of *V. vulnificus* strains and evaluate their cytotoxicity using a model of continuous cell lines. Analysis of the results of whole-genome sequencing showed that all strains possessed the *vvhA* and *rtxA1* genes, however, they differed in the content of variable effector domains. It has been shown that the optimal model for assessing the cytotoxic activity of *V. vulnificus* strains in vitro is the HeLa cell culture (human cervical carcinoma cells). It has been established that the absence of one of the effector domains can reduce the cytotoxicity of *V. vulnificus*. Moreover, only in the presence of the RRSP (specific endopeptidase) and RID (guanosine triphosphatase inactivating) domains, the studied strains had an irreversible cytotoxic effect on cell culture, which probably indicates their key role in the implementation of biological activity.

Key words: *Vibrio vulnificus*, virulence factors, cytolysin, MARTX, cell culture, effector domains

For citation: Tsyurulina O.A., Temyakova S.Yu., Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Chemisova O.S. Characterization of genes of pathogenicity factors and assessment of cytotoxic activity of *Vibrio vulnificus in vitro*. Bacteriology. 2024; 9(3): 70–76. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-70-76

Для корреспонденции:

Цырулина Оксана Алексеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9122

Статья поступила 20.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Oksana A. Tsyurulina, PhD in Biological Sciences, Senior researcher of the laboratory «Collection of pathogenic microorganisms», Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 M. Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9122

The article was received 20.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

V*ibrio vulnificus* является грамотрицательным условно-патогенным галофильным микроорганизмом, который широко распространен в морской среде по всему миру. Этот патоген способен вызывать острый гастроэнтерит, некротизирующие раневые инфекции и опасную для жизни септицемию, особенно у восприимчивых людей с ослабленным иммунитетом, при этом смертность составляет >50% [1]. Случаи инфицирования людей *V. vulnificus* могут возникнуть в результате употребления в пищу зараженных морепродуктов (обычно моллюсков, таких как устрицы) или при контакте морской загрязненной воды с открытыми ранами или поврежденной кожей [2]. *V. vulnificus* встречается в прибрежных или эстуарийных средах с температурой воды от 9 до 31°C. Об инфицировании *V. vulnificus* сообщается по всему миру, причем часто регистрируются случаи в Соединенных Штатах Америки, Европе и Корее [3].

В России эти вибрионы выделяют из проб морской воды на Черноморском побережье: в городах Новороссийск, Сочи, Ялта (Республика Крым), в Таганрогском заливе Азовского моря, а также из проб балластных вод судов, прибывающих в международные порты Ростова, Таганрога и Азова из-за рубежа [4–6].

Проведенный ранее анализ литературы показал, что патогенность *V. vulnificus* обусловлена многими факторами, так как этот возбудитель экспрессирует множество клеточ-

но-ассоциированных и секретируемых факторов, которые потенциально способствуют патогенности. Однако наибольший вклад в развитие инфекции, обусловленной *V. vulnificus*, вносят порообразующий холестерин-зависимый цитолизин VVH (*V. vulnificus* hemolysin) и высокомолекулярный цитотоксин MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin), под воздействием которых может происходить накопление жидкости в просвете кишечника, приводящее к диарее, частичному параличу и некрозу тканей в тонком кишечнике с последующей диссеминацией в кровоток и другие ткани [7]. Многими авторами было показано, что именно токсин MARTX, который на 80–90% гомологичен RtxA *V. cholerae* [8], играет важную роль в проявлении цитотоксичности *V. vulnificus* по отношению к эукариотическим клеткам, нарушая барьерные свойства мембраны клетки-хозяина, вызывая округление клеток и их гибель [9, 10]. MARTX содержит ряд активных доменов, необходимых для проявления биологической активности. Это домен CPD (цистеиновой протеазы) и эффекторный домен АВН (α/β -гидролазы), RID (инактивирующий ГТФазу), MCF (аутопротеолитической цистеиновой протеазы), DUF (домен неизвестной функции) и RRRSP (специфической эндопептидазы) [11]. Эффекторы токсина MARTX обычно действуют, нарушая один из 3 ключевых клеточных процессов: динамику цитоскелета, передачу сигналов GTPase или везикулярный транспорт. Ранее

Таблица 1. Характеристика штаммов *V. vulnificus*, взятых в исследование
 Table 1. Characteristics of *V. vulnificus* strains taken into the study

п/п №	Номер штамма / Strain number	Дата выделения / Isolation date	Источник выделения / Source of isolation	Место выделения / Place of isolation
1	13344	нет данных / no data	человек / man	США / USA
2	14100	1989	морская вода / sea water	г. Новороссийск / Novorossiysk
3	15828	1988	рыба / fish	г. Паланга, Литва / Palanga, Lithuania
4	15832	1991	человек / man	г. Бердянск, Украина / Berdyansk, Ukraine
5	15885	нет данных / no data	человек / man	Швеция / Sweden
6	19720	2014	балластная вода / ballast water	порт Таганрог, с. Сайда / Taganrog port, Saida village
7	20616	2020	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
8	20617	2020	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
9	21001	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
10	21002	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
11	21004	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
12	21005	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
13	21007	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
14	21009	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
15	21012	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
16	21013	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
17	21015	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
18	21017	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
19	21019	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
20	21021	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
21	21023	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
22	21024	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
23	21030	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
24	21032	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay

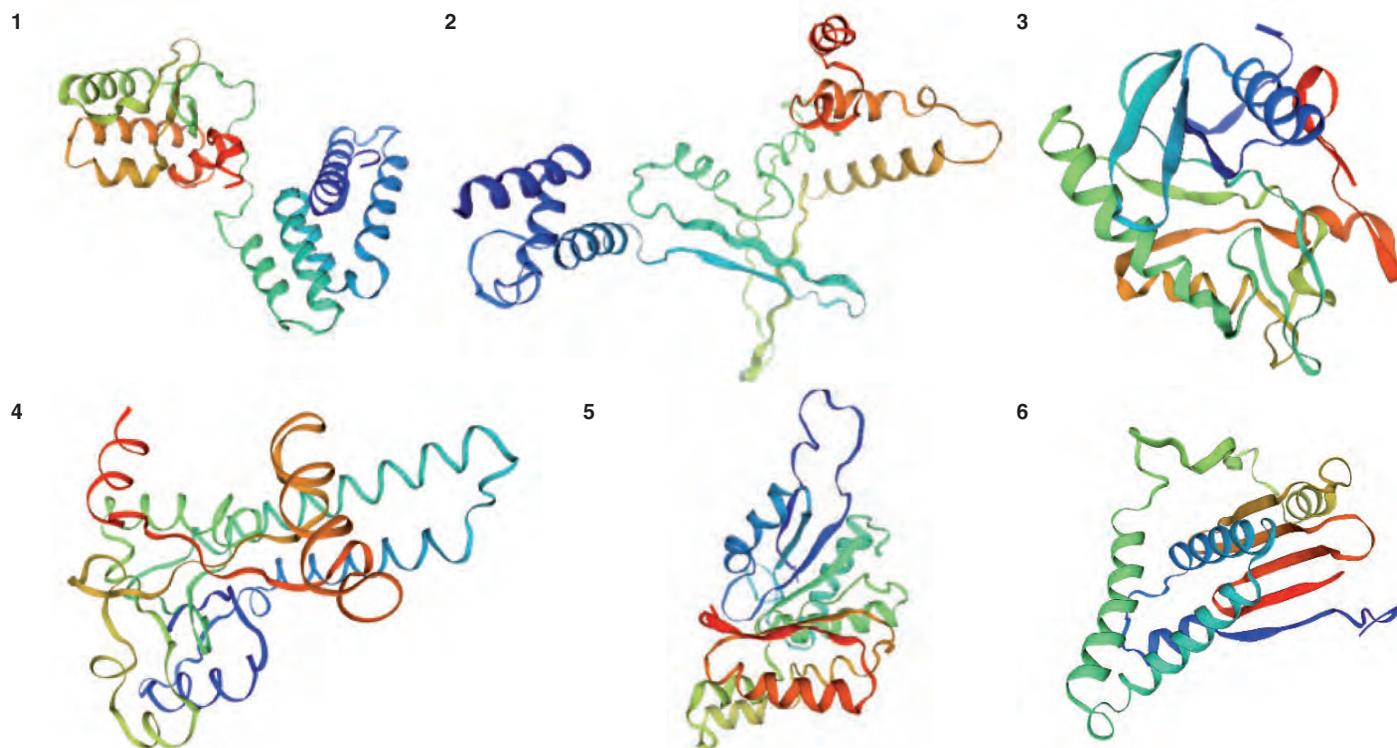


Рис. 1. 3D-структура доменов цитотоксина MARTX штамма *V. vulnificus* 21007.

- 1 – домен RRSP (специфической эндопептидазы)
- 2 – домен RID (инактивирующий ГТФазу)
- 3 – домен CPD (цистеиновой протеазы)
- 4 – домен DUF (домен неизвестной функции)
- 5 – домены ABH (α/β -гидролазы)
- 6 – MCF (аутопротеолитической цистеиновой протеазы)

Fig. 1. 3D structure of the MARTX cytotoxin domains of the *V. vulnificus* 21007 strain.

- 1 – RRSP (specific endopeptidase domain)
- 2 – RID (GTPase inactivating domain)
- 3 – CPD (cysteine protease domain)
- 4 – DUF (domain of unknown function) domain
- 5 – ABH (alpha-beta hydrolase) domains
- 6 – MCF (autoproteolytic cysteine protease)

установлено, что удаление любого из доменов может снизить эффективность цитотоксина и вирулентность *V. vulnificus* [12]. Известно, что эффекторные домены токсинов MARTX различаются не только у разных видов бактерий, но и у разных штаммов одного и того же вида. Более того, даже небольшие различия в аминокислотной последовательности и пространственном строении токсинов определяют различие в спектре их биологической активности [13].

Общепринятой моделью для изучения биологической активности бактериальных токсинов является культура клеток позвоночных, которая по чувствительности сопоставима с разрешающей способностью биопробы [14, 15].

В связи с вышеизложенным цель данной работы – провести генетическое скрининговое тестирование детерминант патогенного потенциала штаммов *V. vulnificus* и оценить их цитотоксичность на модели перевиваемых клеточных линий.

Материалы и методы

В работе были использованы 24 штамма *V. vulnificus*, выделенные в период 1989–2022 гг. из различных мест и источников (табл. 1).

Для сравнительного изучения биологической активности *V. vulnificus* в качестве моделей использовали паспортизированные перевиваемые клеточные линии L929 (фибробласты мыши) и HeLa (клетки эпителиоидной карциномы шейки

матки человека), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург) и хранящиеся в криобанке ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

Монослойные клеточные культуры предварительно пассировали в ростовой среде (RPMI-1640 с 10% сыворотки плода коровы и 2 мМ глутамина). Общепринятыми методами проводили процедуру снятия клеток с помощью растворов версена и трипсина и готовили клеточную суспензию. Клетки высевали в 96-луночные планшеты в такой плотности, чтобы культура не достигла слияния в монослой (не более 5000 клеток/лунку). Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C (5% CO₂, влажность не менее 70%) в течении 18 ч. Все манипуляции с клетками проводили в ламинарно-поточковом шкафу с принудительной подачей стерильного воздуха [16, 17].

Для культивирования *V. vulnificus* использовали агар Мартена с добавлением натрия хлорида до 1,5%. В дальнейшую работу брали только чистые культуры или изолированные колонии микроорганизмов.

С целью элиминации токсического действия питательных бактериологических сред суточные агаровые культуры штаммов *V. vulnificus* засеивали в пробирку с 3 мл среды RPMI-1640 и инкубировали при 37°C в течении 24 ч в стационарных условиях. В дальнейшую работу по оценке действия токсина брали бесклеточные супернатанты. Для этого

Таблица 2. Оценка цитотоксической активности штаммов *V. vulnificus* на культуре клеток HeLa
 Table 2. Evaluation of cytotoxic activity of *V. vulnificus* strains on HeLa cell culture

п/п №	№ штамма / Strain No.	Гены / Genes								Результат действия токсина / The result of the action of the toxin		Итоговый результат / Final result
		vvhA	rtxA1	Домены гена / Gene domains rtxA1						24 ч	48 ч	
				MCF	ABH	CPD	DUF	RID	RRSP			
1	13344	+	+	+	+	+	+	+	-	1/100	1/10	обратимое / reversible
2	14100	+	+	+	+	+	+	+	+	1/2	1/2	необратимое / irreversible
3	15828	+	+	+	+	+	+	+	-	1/10	1/2	обратимое / reversible
4	15832	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
5	15885	+	+	+	+	+	+	+	-	1/2	-	обратимое / reversible
6	19720	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	20616	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
8	20617	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
9	21001	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
10	21002	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11	21004	+	+	+	+	+	-	-	+	1/2	-	обратимое / reversible
12	21005	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
13	21007	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
14	21009	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
15	21012	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
16	21013	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
17	21015	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
18	21017	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
19	21019	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
20	21021	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
21	21023	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
22	21024	+	+	+	+	+	+	+	+	1/2	1/2	необратимое / irreversible
23	21030	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
24	21032	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
25	RPMI-1640									-	-	-
26	RPMI-1640 + 1% сыв-ка / serum									-	-	-

«1/2-1/100» – разведение, в котором наблюдался цитотоксический эффект;
 «-» – отрицательный результат (отсутствие признака).
 “1/2-1/100” – dilution in which cytotoxic effect was observed;
 “-” – negative result (absence of sign).

суточные бульонные культуры центрифугировали при 8000 об./мин в течении 40 мин. В связи с нестабильностью токсинов контроль специфической стерильности не проводили и с супернатантами работали как с патогенными биологическими агентами (ПБА), т.е. работу проводили с необеззараженными образцами¹.

Для оценки цитотоксической активности вибрионов исследуемые пробы титровали в 96-луночном планшете в объеме 0,05 мл RPMI-1640 с 1% сыворотки крупного рогатого скота и вносили в лунки с клетками эукариот.

Предварительно из лунок с подготовленной культурой клеток отбирали среду и вносили образец в определенном разведении с соблюдением принципов стерильности. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор и выдерживали в течение 24–48 ч при 37°C, 90%-й влажности и 5% CO₂.

¹ СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.

Морфологические и деструктивные изменения клеток-мишеней оценивали *ad oculum* через 24 ч в инвертированном микроскопе. Поскольку действие токсина обратимо, через 48 ч проводили повторный учет результатов. Биологическую активность токсинсодержащих образцов испытуемых штаммов на культуре клеток оценивали по четырехкrestной системе [18].

Полногеномное секвенирование взятых в работу штаммов было проведено на платформе Illumina MiSeq. Поиск наличия генов осуществлялся с помощью программы Fragment Extractor (<http://antiplague.ru/fragment-extractor/>). В качестве референсных генов доменов MARTX были использованы нуклеотидные последовательности штамма *V. vulnificus* CICESE-368 из базы данных NCBI.

3D-моделирование структуры токсина штамма *V. vulnificus* осуществляли с использованием web-ресурса SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

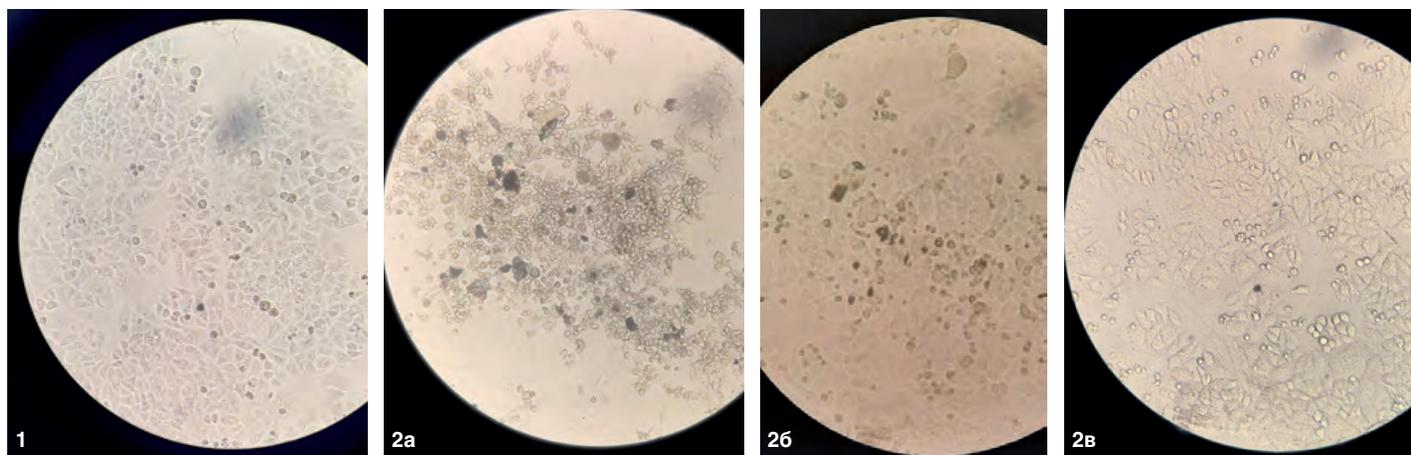


Рис. 2. Цитотоксическое действие штамма *V. vulnificus* №13344 на культуру клеток HeLa. Фазово-контрастная микроскопия (увеличение 4×60).

1 – контроль жизнеспособности клеток в среде культивирования;
2 – воздействие на клетки (округление клеток и гибель):
а) разведение 1/2 – на ++++;
б) разведение 1/10 – на +++;
в) разведение 1/100 – на +.

Fig. 2. Cytotoxic effect of *V. vulnificus* strain 13344 on HeLa cell culture. Phase-contrast microscopy (magnification 4×60).

1 – control of cell viability in the culture medium;
2 – effect on cells (cell rounding and death):
a) dilution 1/2 – by ++++;
b) dilution 1/10 – by +++;
c) dilution 1/100 – by +.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования было проведено полногеномное секвенирование штаммов *V. vulnificus*. На основании анализа генов факторов патогенности было установлено наличие гена, кодирующего белок гемолизина/цитоллизина (*vvhA*), у всех взятых в работу штаммов. Ген *rtxA1*, кодирующий основной цитотоксин MARTX *V. vulnificus*, ответственный за цитотоксические и цитопатические изменения клеток, включая некроз и апоптоз во время инфекции [19], также присутствовал у всех штаммов. С помощью веб-ресурса SWISS-MODEL было произведено моделирование пространственной структуры доменов цитотоксина MARTX исследуемых штаммов. На рис. 1 продемонстрирована 3D-структура данных доменов на примере штамма *V. vulnificus* 21007.

Необходимо отметить различия по содержанию вариабельных эффекторных доменов у взятых в работу штаммов (табл. 2). Домен цистеинпротеазы (CPD), который ответствен за расщепление молекулы токсина при переходе доменов с токсическим действием в цитоплазму клеток-хозяев и домен α/β -гидролазы (ABH), специфически связанный с ингибированием фагоцитоза, аутофагии и транспорта эндоцитов, имели все взятые в работу штаммы. Домен аутопротеолитической цистеиновой протеазы (MCF), как принято считать, ассоциированный с индукцией апоптоза [11], отсутствовал только у одного штамма *V. vulnificus* 21005. Домены RID (инактивирующий ГТФазу), DUF (домен неизвестной функции) и RRSP (специфической эндопептидазы) присутствовали у испытуемых штаммов в разных сочетаниях.

Для определения цитотоксической активности исследуемых изолятов *V. vulnificus* использовали культуры клеток L-929 (фибробласты мышей) и HeLa (клетки карциномы шейки матки человека). Эксперименты на каждой из клеточных линий показали, что клетки HeLa отличались большей

чувствительностью к действию токсинсодержащих образцов штаммов *V. vulnificus*, поэтому они и были использованы в дальнейшей работе. Просмотр клеток HeLa в микроскопе после инкубации с опытными пробами *V. vulnificus* позволил выявить изменение их морфологии в виде набухания, округления, утончения или полного разрушения клеток. В то же время клетки HeLa в контроле были представлены типичным монослоем на всем протяжении эксперимента. Результаты изучения биологической активности изолятов *V. vulnificus* на культуре клеток HeLa в зависимости от наличия основных факторов патогенности отражены в табл. 2.

Данные, представленные в табл. 2, демонстрируют, что штаммы в зависимости от содержания тех или иных доменов токсина MARTX проявляли различную степень цитотоксичности и цитопатогенности в отношении монослойной клеточной линии HeLa. Штаммы, которые содержали весь комплекс доменов токсина MARTX, проявляли выраженный необратимый цитотоксический эффект через 24 и 48 ч во всех разведениях, начиная от 1/2 до 1/100 (рис. 2).

Стоит отметить также, что штаммы *V. vulnificus* №№ 13344, 15828, 15885, у которых отсутствовал только домен специфической эндопептидазы (RRSP), и № 21004, без доменов DUF (неизвестной функции) и RID (инактивирующий ГТФазу), проявляли цитотоксический эффект, однако его действие было обратимо через 48 ч. У штаммов *V. vulnificus* №№ 19720, 21023 и 21032, которые не имели в составе токсина MARTX только домена специфической эндопептидазы, морфологических и деструктивных изменений клеток-мишени зарегистрировано не было. Таким образом, выявлена закономерность между наличием доменов RRSP и RID в составе токсина и проявлением биологической активности. При отсутствии одного из этих доменов цитотоксическое действие штаммов *V. vulnificus* на культуру клеток снижалось или имело обратимый эффект. Это может свидетельствовать о важной роли упомянутых доменов в проявлении цитотоксической активности *V. vulnificus*.

Заключение

В результате сравнительного изучения свойств коллекционных перевиваемых клеточных линий животных L929 (мышинных фибробластов) и человека HeLa (клетки карциномы шейки матки человека) установлено, что наиболее эффективной моделью для оценки цитотоксичности штаммов *V. vulnificus in vitro* является монослойная клеточная линия HeLa. Клетки этой линии обладали относительно высокой чувствительностью в отношении токсинсодержащих штаммов, что позволяет рекомендовать ее в качестве модели для оценки цитотоксической активности возбудителя *V. vulnificus*.

Скрининг штаммов *V. vulnificus* на перевиваемой клеточной линии HeLa показал, что штаммы, несущие гены *vvhA*, *rtxA1* и имеющие все шесть доменов токсина MARTX, обладали необратимым цитотоксическим эффектом, который регистрировалась через 24 и 48 ч после контакта с клетками-мишенями.

По содержанию эффекторных доменов исследуемые изоляты *V. vulnificus* отличались. Отсутствие любого из доменов, особенно RRSP или RID, сопровождалось уменьшением активности токсина MARTX, и, как следствие, снижалось цитотоксическое действие *V. vulnificus* на культуру клеток.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. D'Souza C, Prithvisagar KS, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I, Kumar BK. Exploring the Pathogenic Potential of *Vibrio vulnificus* Isolated from Seafood Harvested along the Mangaluru Coast, India. *Microorganisms*. 2020 Jul 4;8(7):999. DOI: 10.3390/microorganisms8070999
2. Horseman MA, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis*. 2011 Mar;15(3):e157-66. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.11.003
3. Duong-Nu TM, Jeong K, Hong SH, Puth S, Kim SY, Tan W, et al. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. *PLoS Pathog*. 2019 Aug 22;15(8):e1007767. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007767
4. Смоликова ЛМ, Ломов ЮМ, Хоменко ТВ, Мурначев ГП, Кудрякова ТА, Фецайлова ОП, и др. Галофильные вибрионы, обусловившие вспышку пищевой токсикоинфекции в г. Владивостоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2001;6:3-7.
5. Гальцева ГВ, Зайденов АМ, Брудный РА, Левкович АА, Нагорный СИ. Вибриофлора водных объектов рекреационных зон черноморского побережья и ее роль в патологии человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1994;6:48-50.
6. Чемисова ОС, Рыковская ОА, Даликова РР, Непомнящая НБ, Чайка ИА, Водяницкая СЮ, и др. Характеристика штаммов *Vibrio parahaemolyticus* и других галофильных вибрионов, выделенных из балластных вод судов, прибывающих в международные порты Ростовской области. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014;7(256):42-45.

7. Цырулина ОА, Чемисова ОС, Носков АК. Факторы патогенности *Vibrio vulnificus*. *Обзор. Здоровье населения и среда обитания*. 2022;6:59-65. DOI:10.35627/2219-5238/2022-30-6-59-65
8. Kim YR, Lee SE, Kang IC, Nam KI, Choy HE, Rhee JH. A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium-mediated mitochondrial dysfunction. *J Infect Dis*. 2013 May 1;207(9):1406-15. DOI: 10.1093/infdis/jis746
9. Lee BC, Choi SH, Kim TS. *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect*. 2008 Nov-Dec;10(14-15):1504-13. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.09.006
10. Kim YR, Lee SE, Kook H, Yeom JA, Na HS, Kim SY, et al. *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cell Microbiol*. 2008 Apr;10(4):848-62. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01088.x
11. Gavin HE, Beubier NT, Satchell KJ. The Effector Domain Region of the *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine. *PLoS Pathog*. 2017 Jan 6;13(1):e1006119. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006119
12. Gavin HE, Satchell KJF. RRSP and RID Effector Domains Dominate the Virulence Impact of *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin. *J Infect Dis*. 2019 Feb 23;219(6):889-897. DOI: 10.1093/infdis/jiy590
13. Satchell KJF. Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) Toxins of Vibrios. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3):10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014
14. Walum E, Ekwall B. Cell toxicology a new paradigm. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2000;28:159.
15. Пименова ЕВ, Храпова НП. Изучение потенциальной токсичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;7:247-250.
16. Блажевич ОВ. Культивирование клеток: Курс лекций. Мн.: БГУ, 2004.
17. Тартаковский АД. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. *Методы культивирования клеток*. Л.: Наука, 1988;44-63.
18. Фрешни Р. *Культура животных клеток: практическое руководство*. 5-е изд. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010.
19. Kim BS, Gavin HE, Satchell KJ. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin. *mBio*. 2015;6(2): e00324-15. DOI: 10.1128/mBio.00324-15

References

1. D'Souza C, Prithvisagar KS, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I, Kumar BK. Exploring the Pathogenic Potential of *Vibrio vulnificus* Isolated from Seafood Harvested along the Mangaluru Coast, India. *Microorganisms*. 2020 Jul 4;8(7):999. DOI: 10.3390/microorganisms8070999
2. Horseman MA, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis*. 2011 Mar;15(3):e157-66. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.11.003
3. Duong-Nu TM, Jeong K, Hong SH, Puth S, Kim SY, Tan W, et al. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. *PLoS Pathog*. 2019 Aug 22;15(8):e1007767. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007767
4. Smolikova LM, Lomov IM, Khomenko TV, Murnachev GP, Kudriakova TA, Fetсайлова OP, et al. Studies on halophilic vibrios causing a food poisoning outbreak in the city of Vladivostok. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2001;6:3-7. (In Russian).
5. Gal'tseva GV, Zaidenov AM, Brudnyĭ RA, Levkovich AA, Nagornyyĭ SI. The *Vibrio* flora of the bodies of water in the recreational areas along the Black Sea shore and

- its role in human pathology. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1994 Nov-Dec;(6):48-50. (In Russian).
6. Chemisova OS, Rykovskaya OA, Dalikova RR, Nepomnjashhaja NB, Chajka IA, Vodjanickaja SJu, et al. Characterization of *Vibrio* human pathogens isolated from ballast waters of ships arriving to rostov region international ports. Public Health and Life Environment. 2014;7(256):42-45. (In Russian).
 7. Tsyurulina OA, Chemisova OS, Noskov AK. Pathogenicity factors of *Vibrio vulnificus*: a review. Public Health and Life Environment. 2022;6:59-65. DOI: 10.35627/2219-5238/2022-30-6-59-65 (In Russian).
 8. Kim YR, Lee SE, Kang IC, Nam KI, Choy HE, Rhee JH. A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium-mediated mitochondrial dysfunction. J Infect Dis. 2013 May 1;207(9):1406-15. DOI: 10.1093/infdis/jis746
 9. Lee BC, Choi SH, Kim TS. *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. Microbes Infect. 2008 Nov-Dec;10(14-15):1504-13. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.09.006
 10. Kim YR, Lee SE, Kook H, Yeom JA, Na HS, Kim SY, et al. *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. Cell Microbiol. 2008 Apr;10(4):848-62. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01088.x
 11. Gavin HE, Beubier NT, Satchell KJ. The Effector Domain Region of the *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine. PLoS Pathog. 2017 Jan 6;13(1):e1006119. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006119
 12. Gavin HE, Satchell KJF. RRSP and RID Effector Domains Dominate the Virulence Impact of *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin. J Infect Dis. 2019 Feb 23;219(6):889-897. DOI: 10.1093/infdis/jiy590
 13. Satchell KJF. Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) Toxins of Vibrios. Microbiol Spectr. 2015 Jun;3(3):10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014
 14. Walum E, Ekwall B. Cell toxicology a new paradigm. Alternatives to Laboratory Animals. 2000;28:159.
 15. Pimenova EV, Khrapova NP. Study of potential cytotoxicity of antigens complex *Burkholderia pseudomallei* on model of continuous cell cultures. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2015;7:247-250. (In Russian).
 16. Blazhevich OV. Cell cultivation: A course of lectures. Mn.: BSU, 2004. (In Russian).
 17. Tartakovskij AD. Nutrient media for the cultivation of mammalian cells. Methods of cell cultivation. L.: Nauka, 1988;44-63. (In Russian).
 18. Freshni R. Animal cell culture: a practical guide. 5th ed. Moscow: Binom. Laboratory of Knowledge, 2010. (In Russian).
 19. Kim BS, Gavin HE, Satchell KJ. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin. mBio. 2015;6(2): e00324-15. DOI: 10.1128/mBio.00324-15

Информация о соавторах:

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Евдокимова Вероника Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Алексеева Людмила Павловна, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, и.о. зав. лаборатории ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Svetlana Yu. Temyakova, Junior Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Veronika V. Evdokimova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Lyudmila P. Alekseeva, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Chief researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Ol'ga S. Chemisova, PhD in Biological Sciences, acting Head of the laboratory, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

НОВОСТИ НАУКИ

Эффективное редактирование генома

Инфекция мочевыводящих путей (ИМП) является одной из наиболее распространенных бактериальных инфекций в мире. Основным возбудителем ИМП является уropатогенная *Escherichia coli* (UPEC). Существует настоятельная необходимость в новых стратегиях профилактики и лечения ИМП из-за растущей частоты возникновения резистентности к антимикробным препаратам среди уropатогенов. ABU 83972, бессимптомный штамм *E. coli*, вызывающий бактериурию, предотвращает ИМП, подавляя колонизацию UPEC. Однако природа конкуренции и подавления роста UPEC ABU 83972 неясна и является предметом этого исследования. Охарактеризована кинетика роста ABU 83972 и уropатогенов в моче человека и лабораторных средах. Затем была проведена серия экспериментов по конкурентному совместному культивированию, в которых ABU 83972 и уropатогены были инокулированы в соотношении 1 : 1 в моче человека и в различные среды, и было определено их относительное содержание. В моче человека ABU 83972 превзошел UPEC и дополнительные уropатогены, достигнув 90% от общей популяции после 24 часов инкубации. Напротив, UPEC превзошел ABU 83972 в минимальных средах LB и M9 и продемонстрировал лучшую колонизацию, чем ABU 83972 в мочевом пузыре мышей. Поскольку сконструированные живые материалы (ELM) могут использоваться для удержания интересующего организма в определенном месте, были разработаны ELM, содержащие ABU 83972, которые эффективно превзошли UPEC в моче человека. Эта работа устанавливает, что ABU 83972 превзойдет UPEC в зависимости от среды и плотности клеток, что подчеркивает важность метаболитов и питательных веществ, обнаруженных в моче человека, как детерминант конкурентной приспособленности ABU 83972.

George I, Kalairaj MS, Zimmern PE, Ware TH, Subashchandrabose S.
Competitive fitness of asymptomatic bacteriuria E. coli strain 83972 against uropathogens in human urine.
Infect Immun. 2024 Jun 11;92(6):e0017324. DOI: 10.1128/iai.00173-24

Определение антагонистической активности пробиотических штаммов в отношении клинических изолятов и микроорганизмов, персистирующих в пищеварительном тракте пушных зверей семейства *Canidae* клеточного содержания

А.С.Сюткина, Т.А.Скуднова, В.Г.Комоско, Г.В.Комоско, О.А.Новикова

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Российская Федерация

Статья посвящена изучению антагонистической активности между микроорганизмами, в частности трех штаммов лактобацилл в отношении клинических культур возбудителей госпитальных инфекций, в т.ч. антибиотикорезистентных, и культур, выделенных из желудочно-кишечного тракта клеточных пушных зверей семейства *Canidae*. На современном этапе взаимоотношения между микроорганизмами рассматриваются комплексно, изучаются механизмы взаимодействия со стороны каждого участвующего в них вида. Согласно требованиям к конструированию пробиотических препаратов отбор новых штаммов проводят по ряду утвержденных методик и оценивают в соответствии с ОФС.1.7.2.0012.15 «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Одним из этапов отбора является изучение антагонистической активности. Целью исследования послужила оценка антагонистической активности пробиотических лактобацилл с использованием двухслойной методики по Фредерику. Антагонистическая активность исследуемых штаммов лактобактерий изучена в отношении 101 группы микроорганизмов, из них 71 штамм был идентифицирован и изучен в отношении лекарственной устойчивости, в т.ч. к антибиотикам. Содержимое пищеварительного тракта получали от клеточных пушных зверей семейства *Canidae*, содержащихся в условиях звероводческого хозяйства ООО «Звероводческое племенное хозяйство «Вятка» Кировской области. Микробиоту желудочно-кишечного тракта выделяли в соответствии с методическими рекомендациями. Выделенные от животных культуры микроорганизмов идентифицировали в основные группы: *Staphylococcus* sp., среди которых выделяли *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*; *Enterococcus* sp. (дифференцировали на *E. faecium* и *E. faecalis*); бактерии группы кишечной палочки, среди которых обнаружены лактозонегативные *Escherichia coli* и *Salmonella* sp.; микроскопические грибы рода *Candida* sp. и *Endomices lactis*. Степень антагонистической активности оценивали по диаметру зоны задержки роста клинических культур возбудителей и групп микроорганизмов, выделенных из желудочно-кишечного тракта клеточных пушных зверей семейства *Canidae*. В результате проведенных исследований установлено, что три штамма: *Lactobacillus plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *L. plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *Lactobacillus buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839, выращенные на среде MRS-4 и изученные по методике Фредерика, обладают высокой антагонистической активностью в отношении штаммов из коллекции клинических лекарственно устойчивых изолятов и культур микроорганизмов, выделенных из желудочно-кишечного тракта клеточных пушных зверей семейства *Canidae*.

Ключевые слова: лактобациллы, антагонистическая активность, микрофлора пищеварительного тракта, пушные звери

Для цитирования: Сюткина А.С., Скуднова Т.А., Комоско В.Г., Комоско Г.В., Новикова О.А. Определение антагонистической активности пробиотических штаммов в отношении клинических изолятов и микроорганизмов, персистирующих в пищеварительном тракте пушных зверей семейства *Canidae* клеточного содержания. Бактериология. 2024; 9(3): 77–82. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-77-82

Determination of antagonistic activity of probiotic strains against clinical isolates and microorganisms persisting in the digestive tract of cage-containing fur animals of the *Canidae* family

A.S.Syutkina, T.A.Skudnova, V.G.Komosko, G.V.Komosko, O.A.Novikova

Vyatka State University, Kirov, Russian Federation

Для корреспонденции:

Сюткина Анна Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра внедрения биотехнологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»

Адрес: 610020, Киров, ул. Володарского, 2
Телефон: (8332) 64-5778

Статья поступила 13.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Anna S. Syutkina, PhD in Veterinary Sciences, Senior Researcher Educational Center for the introduction of Biotechnologies, Vyatka State University

Address: 2 Volodarsky str., Kirov, 610020, Russian Federation
Phone: (8332) 64-5778

The article was received 13.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

The article is devoted to the study of antagonistic activity between microorganisms, in particular three strains of lactobacilli in relation to clinical cultures of pathogens of hospital infections, including antibiotic-resistant and cultures isolated from the gastrointestinal tract of cellular fur-bearing animals of the family *Canidae*. At the present stage, the relationship between microorganisms is considered comprehensively, the mechanisms of interaction on the part of each type of microorganism involved in them are studied. In accordance with the requirements for the design of new probiotic drugs, the selection of new strains is carried out according to a number of approved methods and evaluated in accordance with the OFS.1.7.2.0012.15 "Production probiotic strains and strains for probiotic control". One of the stages of selection is the study of antagonistic activity. The aim of the study was to evaluate the antagonistic activity of probiotic lactobacilli using a two-layer Frederick technique. The antagonistic activity of the studied lactobacillus strains was studied against 101 groups of microorganisms, of which 71 strains were identified and studied for drug resistance, including to antibiotics. The contents of the digestive tract were obtained from cellular fur-bearing animals of the *Canidae* family, kept in the conditions of the fur breeding farm of LLC "Fur breeding breeding farm "Vyatka" of the Kirov region. The microbiota of the gastrointestinal tract was isolated in accordance with the Guidelines. The cultures of microorganisms isolated from animals were identified into the main groups: *Staphylococcus* sp., among which *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* were isolated; *Enterococcus* sp. was differentiated into *E. faecium* and *E. faecalis*; *E. coli* bacteria: *Escherichia coli*, among which were found Lactose-negative *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.; microscopic fungi of the genus *Candida* sp. and *Endomices lactis*. The degree of antagonistic activity was assessed by the diameter of the growth retardation zone of clinical cultures of pathogens and groups of microorganisms isolated from the gastrointestinal tract of cellular fur-bearing animals of the *Canidae* family. As a result of the conducted studies, it was found that three strains: *Lactobacillus plantarum* PL-99 VKPM B-11747, *L. plantarum* PL-98 VKPM B-11746, *Lactobacillus buchneri* BX-99 VKPM B-11839, grown on MRS-4 medium and studied by the Frederick method have high antagonistic activity against strains from the collection clinical drug-resistant isolates and cultures of microorganisms isolated from the gastrointestinal tract of cellular fur-bearing animals of the *Canidae* family.

Key words: Lactobacilli, antagonistic activity, microflora of the digestive tract, fur-bearing animals

For citation: Syutkina A.S., Skudnova T.A., Komosko V.G., Komosko G.V., Novikova O.A. Determination of antagonistic activity of probiotic strains against clinical isolates and microorganisms persisting in the digestive tract of cage-containing fur animals of the *Canidae* family. Bacteriology. 2024; 9(3): 77–82. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-77-82

В кишечнике хищных млекопитающих, как и у других видов животных, обитает свыше 400 видов различных микроорганизмов, представляющих собой отдельный орган – так называемый микробиом [1]. Микробиом человека и животных состоит не только из бактерий, но также из археев и эукариот, таких как простейшие, грибы и нематоды, вирусы [2, 3]. Сложная микробная ассоциация осуществляет преимущественно пищеварительную функцию и защищает организм от действия болезнетворных факторов, в т.ч. и патогенных бактерий, препятствуя их размножению и проникновению в стенку кишечника. Благодаря успешной конкуренции за питательные вещества бактерии кишечника предотвращают колонизацию кишечника патогенными микроорганизмами, выделяя антимикробные соединения, энергозависимые жирные и химически модифицированные желчные кислоты, что создает среду, неблагоприятную для развития патогенных микроорганизмов [4].

Множество разнообразных групп микроорганизмов заселяет желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) любого организма с первых минут жизни. В этот период в кишечнике превалирует кокковая микрофлора и клостридии, затем начинают доминировать неспоровые анаэробные бактерии и к концу первого месяца жизни формируется микробная популяция, сходная с таковой у взрослых особей [5, 6]. В первые дни жизни качественный и количественный состав кишечной микрофлоры животных не способен предотвращать заселение кишечника посторонними микроорганизмами, в т.ч. и патогенными [7]. Становление кишечного нормобиоза в основном завершается к 20–25-суточому возрасту животного, характеризуется преобладанием бифидо- и лактобактерий (в норме – 80–90% всей микрофлоры кишечника). С этого возраста у животных наряду с факторами клеточного и гуморального иммунитета появляется еще одна линия защиты – слизистая оболочка кишечника, содержащая антагонистически активную нормальную микрофлору, препятствующую проникновению патогенов [8, 9]. В первый месяц жизни

животные лишены первичного неспецифического барьера – эту роль выполняет кишечная нормофлора, которая вступает в борьбу с патогенной и условно-патогенной микрофлорой еще до инициации других неспецифических, а затем и специфических механизмов защиты [10].

В состав облигатной нормофлоры ЖКТ человека и животных входят бифидо- и молочнокислые бактерии, при этом ~90% пристеночного содержимого составляют бифидобактерии и бактериоиды [11].

Преобладающей группой эубиотической флоры ЖКТ животных являются бифидобактерии, синтезирующие в процессе метаболизма аминокислоты, полисахариды, витамины группы В (В₁, В₂, В₆), пантотеновую и фолиевую кислоты, уксусную, молочную с примесями муравьиной и янтарной кислоты и другие биологически активные компоненты [11]. Они также улучшают процессы гидролиза и всасывания липидов, белков, углеводов, участвуют в минеральном обмене, препятствуют колонизации кишечника условно-патогенными микроорганизмами за счет высокой колонизирующей способности и адгезивной активности [11–14].

Молочнокислые бактерии являются постоянными обитателями ЖКТ животных. Они присутствуют практически во всех его отделах, поддерживая состояние динамического равновесия в экологической системе «макроорганизм – микроорганизм – внешняя среда». В пищеварительном тракте животных встречаются молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* следующих видов: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus* и др. [15].

Лактобациллы выполняют важную роль в поддержании колонизационной резистентности организма, а также участвуют в пищеварительной, биосинтетической, детоксицирующей и других функциях нормофлоры человека и животных. Наряду с бифидобактериями они играют значительную роль в метаболизме белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот, желчных кислот, холестерина, гормонов, оксалатов. Они также способны деградировать отдельные токсины,

канцерогены, аллергены, препятствуют всасыванию токсичных продуктов метаболизма, в первую очередь аммиака и отдельных аминов, предупреждают избыточное развитие гнилостных процессов в кишечнике, инактивируют вредные, в т.ч. канцерогенные, ферменты и др. [16].

Протеолитические бактерии в норме выполняют следующие положительные функции. Эшерихии (кишечные палочки) способствуют гидролизу лактозы, участвуют в продукции витаминов, в первую очередь витамина К, витаминов группы В, вырабатывают колицины, тормозящие рост энтеропатогенных кишечных палочек, стимулируют антителообразование. Бактероиды расщепляют желчные кислоты, участвуют в процессах липидного обмена, стимулируют иммунную систему. Энтерококки сбраживают разнообразные углеводы с образованием в основном молочной кислоты, без образования газа, сбраживают лактозу, восстанавливают нитраты.

Состав кишечной микрофлоры у разных животных может отличаться по количеству микробных групп при сохранении их видового состава, а также большинству животных свой-

ственны общие усредненные показатели видового и количественного состава микробиоты для разных областей их тела [17].

Исследования микробных показателей ЖКТ у пушных зверей клеточного содержания представлены недостаточно. Авторами установлены основные группы микроорганизмов, персистирующих в ЖКТ пушных зверей промышленного содержания: *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, в т.ч. с дифференциацией на сероводородобразующие и лактозонегативные, дрожжи и дрожжеподобные грибы, бактерии рода *Proteus*, *Clostridium* sp., *Salmonella* sp. и др. [18, 19].

Отбор штаммов для конструирования новых пробиотических препаратов проводят по ряду утвержденных методик и оценивают в соответствии с ОФС.1.7.2.0012.15 «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Одним из этапов отбора является изучение антагонистической активности.

Цель работы: оценить антагонистическую активность штаммов микроорганизмов *Lactobacillus plantarum* ПЛ-99

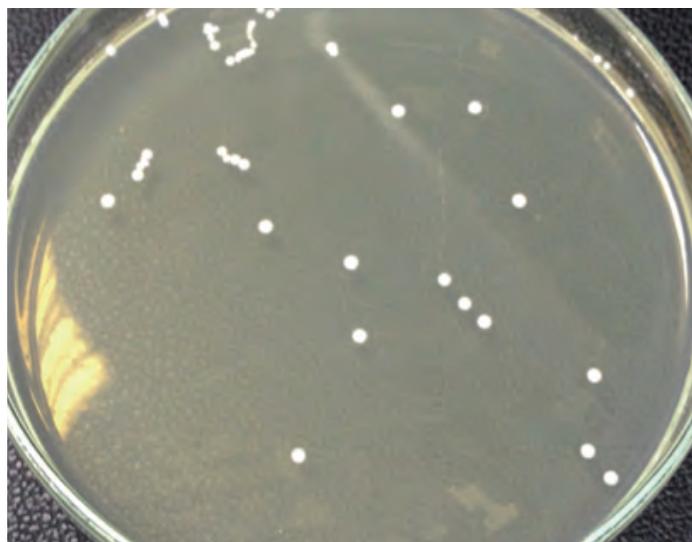


Рис. 1. Рост *L. plantarum* ПЛ-99 на среде MRS-4.
Fig. 1. Growth of *L. plantarum* PL-99 on MRS-4 medium.

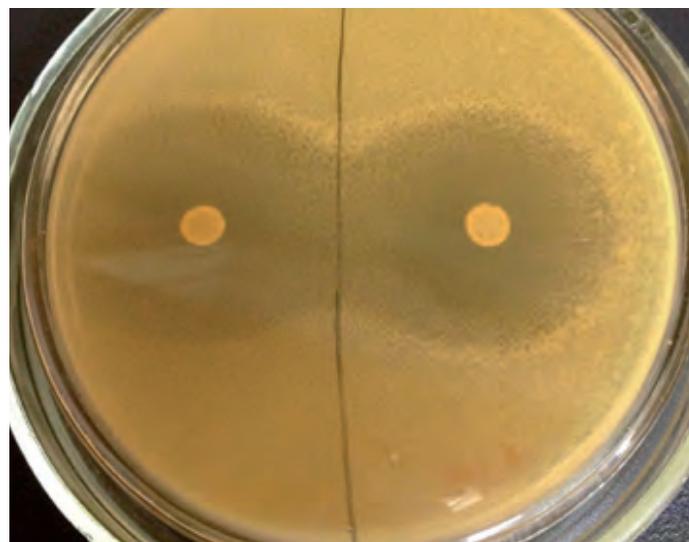


Рис. 2. Антагонистическая активность штамма *L. plantarum* ПЛ-99 в отношении выделенного из ЖКТ пушных зверей *E. coli*.
Fig. 2. Antagonistic activity of the *L. plantarum* PL-99 strain against *E. coli* isolated from the gastrointestinal tract of fur animals.

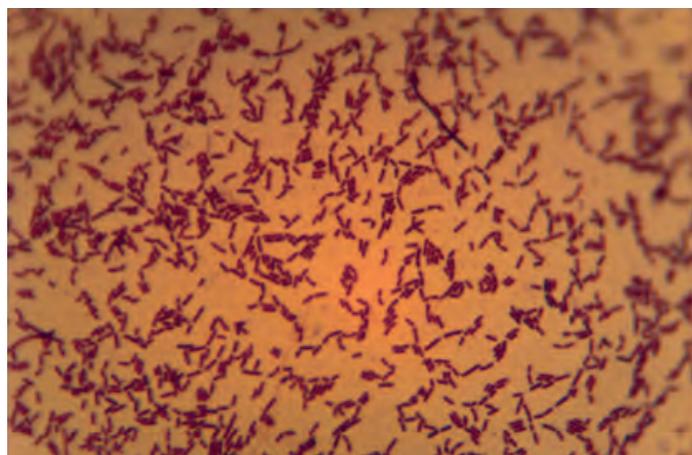


Рис. 3. Микропрепарат *L. plantarum* ПЛ-99, окраска по Граму, объектив $\times 100$.
Fig. 3. Micropreparation of *L. plantarum* PL-99, Gram staining, $\times 100$ objective.

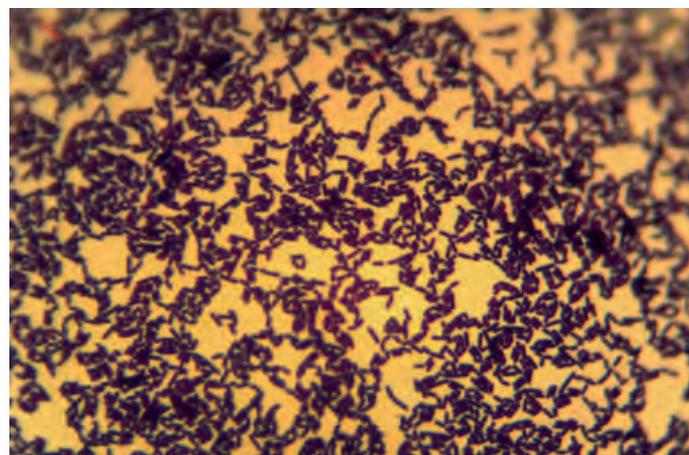


Рис. 4. Микропрепарат *L. buchneri* БХ-99, окраска по Граму, объектив $\times 100$.
Fig. 4. Micropreparation of *L. buchneri* BH-99, Gram staining, $\times 100$ objective.

Таблица. Антагонистическая активность штаммов лактобацилл
Table. Antagonistic activity of lactobacilli strains

Индикаторный штамм / Indicator strain	Кол-во штаммов / Number of strains	Диаметр зон подавления роста, мм / Diameter of growth inhibition zones, mm		
		L. buchneri БХ-99	L. plantarum ПЛ-98	L. plantarum ПЛ-99
<i>Staphylococcus aureus</i> , в т.ч. MRS	10	15–40	18–40	17–45
<i>Staphylococcus aureus</i> , NO 89, ЛУ	1	46	42	60
<i>Staphylococcus aureus</i> , NO 101, ЛУ	1	50	42	54
<i>Staphylococcus sciuri</i> NO 95, ЛУ	1	>60	>60	>60
<i>Enterococcus faecium</i> , в т.ч. ЛУ	7	25–60	25–60	25–60
<i>Enterococcus faecalis</i> , в т.ч. ЛУ	4	22–28	25–30	25–30
<i>Enterococcus gallinarum</i> , в т.ч. ЛУ	2	25–27	30–32	30–32
<i>Enterococcus casseliflavus</i> , ЛУ	1	30	29	28
<i>Listeria monocytogenes</i> , в т.ч. ЛУ	10*	>60	>60	>60
<i>Klebsiella pneumonia</i> NO 77, ЛУ	1*	>60	>60	50
<i>Klebsiella pneumonia</i> NO 94/1, ЛУ	1*	>60	>60	>60
<i>Acinetobacter baumannii</i> NO 91, ЛУ	1*	>60	>60	>60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NO 128, ЛУ	1*	>60	>60	>60
<i>Enterobacter cloacae</i> NO 110, ЛУ	1*	60	56	60
<i>Enterobacter kobei</i> NO 105, ЛУ	1*	>60	>60	>60
<i>Raoultella ornithinolytica</i> NO 109, ЛУ	1*	>60	>60	>60
<i>Raoultella planticola</i> NO 108, ЛУ	1	27	27	31
<i>Aeromonas hydrophila</i> NO 10, ЛУ	1	28	30	32
<i>Leclercia adecarboxylata</i> NO 112, ЛУ	1	27	27	30
<i>Pluralibacter pyrinus</i> NO 11, ЛУ	1	27	30	30
<i>Stenothrophomonas maltophilia</i> NO 3420, ЛУ	1	34	36	35
<i>Shigella flexneri</i> B 8116, ЛУ	1	26	30	30
<i>Shigella sonnei</i> S form, ЛУ	1	25	22	30
<i>Shigella dysenteriae</i> Tuck 1362, ЛУ	1	40	30	30
<i>Escherichia coli</i> , в т.ч. ЛУ	14	20–27	23–30	22–32
<i>Salmonella typhimurium</i> 490/60	1	25	26	29
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1	26	25	30
<i>Salmonella infantis</i> Новгород 1	1	28	27	30
<i>Salmonella enteritidis</i> 237	1	20	23	23
<i>Salmonella gallinarum</i> 95	1	25	25	24
Культуры, выделенные из ЖКТ клеточных пушных зверей семейства <i>Canidae</i> / Cultures isolated from the gastrointestinal tract of caged fur-bearing animals of the <i>Canidae</i> family				
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	15–45	18–50	17–45
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	22–50	18–40	25–53
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5	30–60	28–55	25–60
<i>Enterococcus faecium</i>	3	30–60	25–55	25–60
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	22–40	25–38	25–45
<i>Escherichia coli</i>	3	25–40	30–45	28–43
<i>Escherichia coli</i> лактозонегативная	2	22–35	28–40	22–32
<i>Salmonella</i> sp.	2	25–38	22–35	28–40
микроскопические грибы рода <i>Candida</i> sp	3	25–40	23–40	30–45
<i>Endomices lactis</i>	2	>60	>60	>60

* штаммы лактобацилл индикаторных культурах выращивали на среде MRS-4 в течение 48 ч, остальные в течение 24 ч; ЛУ – лекарственно-устойчивые. / *lactobacilli strains in indicator cultures were grown on MRS-4 medium for 48 hours, the rest for 24 hours; ЛУ – drug-resistant

ВКПМ В-11747, *L. plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *Lactobacillus buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839 для дальнейшего использования в качестве пробиотических штаммов.

Материалы и методы

В качестве культур-антагонистов были взяты три штамма лактобацилл: *L. plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *L. plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *L. buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839, депонированных во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Штаммы лактобактерий выращивали на среде MRS-4 в течение 48 ч. В качестве индикаторных культур использовали штаммы клинических культур возбудителей госпитальных (внутрибольничных) инфекций различных видов, в большинстве своем резистентные к различному набору антибиотиков, а также группы микроорганизмов, выделенных из ЖКТ пушных зверей семейства *Canidae* клеточного содержания (енотовидная собака, лисица и песец). Содержимое ЖКТ получали от пушных зверей звероводческого хозяйства ООО «Звероводческое племенное хозяйство «Вятка» Кировской области общепринятыми методами. Микробиоту ЖКТ выделяли в соответствии с методическими рекомендациями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» (утв. Минздравом РСФСР 14 апреля 1977 г.). Антагонистическую активность штаммов лактобацилл изучали с использованием двухслойной методики по Фредерику [20]. Степень антагонистической активности оценивали по следующим критериям: нулевая – при диаметре зоны отсутствия роста до 1,0 мм, низкая – 1,1–4,9 мм, средняя – 5,0–8,9 мм, высокая – ≥9,0 мм (рис. 1–4).

Выделение микробных культур из ЖКТ пушных зверей проводили в два этапа: 1-й этап – в 45-дневном возрасте, в день или на следующий день после отсадки от матери и переводе на основной рацион, 2-й этап – в возрасте 8 мес. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили общепринятыми методами по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

Выделенные культуры микроорганизмов идентифицировали в основные группы: *Staphylococcus* sp., среди которых выделяли *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*; *Enterococcus* sp. (дифференцировали на *E. faecium* и *E. faecalis*); бактерии группы кишечной палочки: *E. coli*, в т.ч. лактозонегативные, и *Salmonella* sp.; микроскопические грибы рода *Candida* sp. и *Endomices lactis*. Выделение и хранение культур во время исследования проводили на соответствующих питательных средах.

Определения антагонистической активности штаммов лактобактерий проводили двухслойным методом. Исследуемые штаммы *L. plantarum* ПЛ-99 (рис. 2), *L. plantarum* ПЛ-98, *L. buchneri* БХ-99 отобраны по спектру подавления роста в отношении клинических изолятов микроорганизмов и культур, выделенных из кишечного содержимого клеточных пушных зверей семейства *Canidae*.

Результаты исследования и их обсуждение

Антагонистическая активность исследуемых штаммов лактобактерий изучена в отношении 101 группы микроорганизмов, из них 71 штамм был идентифицирован и изучен

в отношении лекарственной устойчивости, в т.ч. к антибиотикам (таблица). При анализе полученных результатов установлено, что зоны задержки роста стафилококковой лекарственно-устойчивой группы ($n = 12$) была в диапазоне от 15 до 60 мм, в зависимости от штамма лактобактерий, при этом в исследованиях, проведенных на микробных культурах *Staphylococcus* sp. ($n = 12$), выделенных из пищеварительного тракта клеточных пушных зверей, диапазоны задержки зоны роста находился в тех же пределах – от 15 до 60 мм. В отношении лекарственно-устойчивых энтерококков ($n = 7$) и у выделенных от животных культур зоны задержки роста составляли от 22 до 60 мм. Штаммы *E. coli* ($n = 14$) из коллекции клинических лекарственно-устойчивых изолятов в отношении исследуемых штаммов лактобактерий дают зону задержки роста от 20 до 32 мм, а у выделенных из содержимого ЖКТ групп *E. coli* – от 22 до 45 мм. Зоны задержки роста в отношении идентифицированных сальмонелл ($n = 5$) были на уровне от 20 до 30 мм, в отношении выделенных групп *Salmonella* sp. ($n = 2$) – в пределах от 22 до 40 мм. Штаммы *L. plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *L. plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *L. buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839 проявляют высокую антагонистическую активность в отношении штаммов из коллекции клинических лекарственно-устойчивых изолятов *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumonia* NO 77, *Klebsiella pneumonia* NO 94/1, *Acinetobacter baumannii* NO 91, *Pseudomonas aeruginosa* NO 128, *Enterobacter cloacae* NO 110, *Enterobacter kobei* NO 105, *Raoultella ornithinolytica* NO 109 и выделенного *E. lactis*, при зона задержки роста составляет >60 мм.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что все три штамма: *L. plantarum* ПЛ-99 ВКПМ В-11747, *L. plantarum* ПЛ-98 ВКПМ В-11746, *L. buchneri* БХ-99 ВКПМ В-11839, выращенные на среде MRS-4 (среда содержит 2,2% глюкозы, рН $7,0 \pm 0,2$) и изученные по методике Фредерика, обладают высокой антагонистической активностью в отношении 71 штамма из коллекции клинических лекарственно-устойчивых изолятов и 30 культур микроорганизмов, выделенных из ЖКТ клеточных пушных зверей семейства *Canidae*. Все изученные штаммы лактобацилл высокоактивны и могут быть использованы для дальнейшего изучения в качестве штаммов для использования в пробиотических кормовых добавках для клеточных пушных зверей семейства *Canidae*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financing

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (Оболонск) научному сотруднику Левчуку В.П. и главному научному сотруднику д.в.н. Светочу Э.А. за оказанную помощь в проведении исследований антагонистической активности лактобацилл с использованием штаммов клинических культур возбудителей госпитальных инфекций различных видов, резистентных к различному набору антибиотиков.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the staff of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор (Obolensk), researcher V.P.Levchuk and chief researcher, Doctor of Veterinary Sciences E.A.Svetoch for their assistance in conducting studies of the antagonistic activity of lactobacilli using strains of clinical cultures of pathogens of hospital infections of various types, resistant to various sets of antibiotics.

Литература

1. Даниленко ВН, Ильясов РА, Юнес РА, Яненко АС, Козловский ЮЕ, Сверчкова НВ, и др. Микробиом животных: поиск биологически активных ингредиентов для создания пробиотиков и фармабиотиков. Успехи современной биологии. 2022;142(4):333-348. DOI: 10.31857/S0042132422040056
2. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med. 2002 Jan 31;346(5):334-9. DOI: 10.1056/NEJMcп011603
3. Микробиота. Под ред. Никонова ЕЛ, Поповой ЕН. М.: Медиа Сфера, 2019.
4. Литусов НВ, Сергеев АГ, Григорьева ЮВ, Ишутинова ВГ. Микрофлора окружающей среды и тела человека. Учебное пособие. Екатеринбург, 2008.
5. Ефимова ЛВ, Удалова ТА. Эффективные микроорганизмы в кормлении крупного рогатого скота и свиней. Красноярский НИИЖ Россельхозакадемии.
6. Guard BC, Mila H, Steiner JM, Mariani C, Suchodolski JS, Chastant-Maillard S. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. PLoS One. 2017 Apr 27;12(4):e0175718. DOI: 10.1371/journal.pone.0175718
7. Скуратович ЕГ. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта у молодяка лани европейской: возрастная динамика в течение первого года жизни. Проблемы биологии продуктивных животных. 2019;3:96-105. DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2019.3.96-105
8. Алешкевич ВН, Субботина ИА, Красочко ПА, и др. Определение микробиоценоза кишечника животных в норме и при дисбактериозах: рекомендации. Витебск: ВГАВМ, 2017.
9. Balouei F, Stefanon B, Sgorlon S, Sandri M. Factors Affecting Gut Microbiota of Puppies from Birth to Weaning. Animals (Basel). 2023 Feb 6;13(4):578. DOI: 10.3390/ani13040578
10. Фисинин ВИ, Лаптев ГЮ, Никонов ИН, Ильина ЛА, Йылдырым ЕА, Филиппова ВА, и др. Изменение бактериального сообщества в желудочно-кишечном тракте кур в онтогенезе. Сельскохозяйственная биология. 2016;51(6):883-890. DOI: 10.15389/agrobiol.2016.6.883rus
11. Функ ИА, Иркитова АН. Биотехнологический потенциал бифидобактерий. Acta Biologica Sibirica. 2016;2(4):67-79.
12. Андреева ИВ. Доказательное обоснование применения пробиотиков для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ. Медицинский совет. 2007;3:60-63.
13. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. Am J Clin Nutr. 2001 Feb;73(2 Suppl):410S-414S. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.410S
14. Сафонова МЕ, Головнева НА. Факторы адгезии молочнокислых бактерий и бифидобактерий. Микробные биотехнологии: фундаментальные и приклад-

ные аспекты: Сборник научных трудов. Том 13. Минск: "Издательский дом "Белорусская наука", 2021;103-118. DOI: 10.47612/2226-3136-2021-13-103-118

15. Ефимова ЛВ, Удалова ТА. Эффективные микроорганизмы в кормлении крупного рогатого скота и свиней. Красноярск: Красноярский НИИ животноводства Россельхозакадемии, 2011.

16. Гнеушева ИА, Солохина ИЮ. Биологические свойства гомопробиотических изолятов лактобактерий – перспективных продуцентов пробиотических препаратов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(7):10-17. DOI 10.29296/25877313-2021-07-02

17. Balouei F, Stefanon B, Sgorlon S, Sandri M. Factors Affecting Gut Microbiota of Puppies from Birth to Weaning. *Animals (Basel)*. 2023 Feb 6;13(4):578. DOI: 10.3390/ani13040578

18. Коновалов АП, Цепилова ИИ, Василевич ФИ, Пигина СЮ. Влияние лечебно-профилактического комплекса ДЛК (диронет, лактобифадол, кератин кормовой) на микробиоценоз кишечника псаца серебристого при токскардиозе. Российский паразитологический журнал. 2021;15(4):91-99. DOI: 10.31016/1998-8435-2021-15-4-91-99

19. Syutkina AS, Berezina YuA, Bespyatykh OYu. Influence of the probiotic subalin on the formation of the gastrointestinal tract microbiota and some immunomorphochemical indicators of the blood of young roccoon dog (*Nuclereutes procyonoides* grey). Scientific research of the SCO countries: synergy and integration: Proceedings of the International Conference, Beijing, 13 января 2023 года. Beijing: Инфинити, 2023;204-211.

20. Fredericq P. Reciprocal antibiotic actions in enteric bacteria. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Apr;142(7-8):543-5. (In French).

References

1. Danilenko VN, Ilyasov RA, Yunes RA, Yanenko AS, Kozlovsky YuE, Sverchkova NV, et al. Microbiome of animals: search for biologically active ingredients for the creation of probiotics and pharmabiotics. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2022;142(4):333-348. DOI: 10.31857/S0042132422040056 (In Russian).

2. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2002 Jan 31;346(5):334-9. DOI: 10.1056/NEJMc011603

3. *Mikrobiota*. Pod red. Nikonova EL, Popovoi EN. M.: "Media Sfera" Publ., 2019. (In Russian).

4. Litusov NV, Sergeev AG, Grigor'eva YuV, Ishutinova VG. *Mikroflora okruzhayushchei sredy i tela cheloveka*. Uchebnoe posobie. Ekaterinburg, 2008. (In Russian).

5. Efimova LV, Udalova TA. *Effektivnye mikroorganizmy v kormlenii krupnogo rogatogo skota i svinei*. Krasnoyarskii NIIzh Rossel'khozakademii. (In Russian).

6. Guard BC, Mila H, Steiner JM, Mariani C, Suchodolski JS, Chastant-Maillard S. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS One*. 2017 Apr 27;12(4):e0175718. DOI: 10.1371/journal.pone.0175718

7. Skuratovich EG. Microbiocenosis of the gastrointestinal tract in young deer european: age dynamics for the first year of life. *Problems of Productive Animal Biology*. 2019;3:96-105. DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2019.3.96-105 (In Russian).

8. Aleshkevich VN, Subbotina IA, Krasochko PA, et al. *Opreделение mikrobiotsenoza kishchnogo trakta zhivotnykh v norme i pri disbakteriozakh: rekomendatsii*. Vitebsk: VGAVM, 2017. (In Russian).

9. Balouei F, Stefanon B, Sgorlon S, Sandri M. Factors Affecting Gut Microbiota of Puppies from Birth to Weaning. *Animals (Basel)*. 2023 Feb 6;13(4):578. DOI: 10.3390/ani13040578

10. Fisinin VI, Laptev GYu, Nikonov IN, Il'ina LA, Yildirim EA, Filippova VA, et al. Poultry gastrointestinal microbiome changes during ontogenesis. *Agricultural*

Biology. 2016;51(6):883-890. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.6.883rus (In Russian).

11. Funk IA, Irkitova AN. Biotechnological potential of bifidobacteria. *Acta Biologica Sibirica*. 2016;2(4):67-79. (In Russian).

12. Andreeva IV. Dokazatel'noe obosnovanie primeneniya probiotikov dlya lecheniya i profilaktiki zabolevaniy ZhKT. *Meditsinskii sovet*. 2007;3:60-63. (In Russian).

13. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73(2 Suppl):410S-414S. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.410s

14. Safonova MA, Golovnyova NA. Adhesion factors of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Mikrobyne biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: Sbornik nauchnykh trudov*. Tom 13. Minsk: "Izdatel'skii dom "Belorusskaya nauka", 2021;103-118. DOI: 10.47612/2226-3136-2021-13-103-118 (In Russian).

15. Efimova LV, Udalova TA. *Effektivnye mikroorganizmy v kormlenii krupnogo rogatogo skota i svinei*. Krasnoyarsk: Krasnoyarskii NII zhivotnovodstva Rossel'khozakademii, 2011. (In Russian).

16. Gneusheva IA, Solokhina IYu. Biological properties of homoprotibiotic isolates of lactobacteria – promising producers of probiotic preparations. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2021;24(7):10-17. DOI 10.29296/25877313-2021-07-02 (In Russian).

17. Balouei F, Stefanon B, Sgorlon S, Sandri M. Factors Affecting Gut Microbiota of Puppies from Birth to Weaning. *Animals (Basel)*. 2023 Feb 6;13(4):578. DOI: 10.3390/ani13040578

18. Konovalov AP, Tsepilova II, Vasilevich FI, Pigina SY. Effect of therapeutic and prophylactic complex DLK (Dironet, Lactobifadol, Forage Keratin) on the intestinal microbiocenosis of the Blue Frost fox at toxascariosis. *Russian Journal of Parasitology*. 2021;15(4):91-99. DOI: 10.31016/1998-8435-2021-15-4-91-99 (In Russian).

19. Syutkina AS, Berezina YuA, Bespyatykh OYu. Influence of the probiotic subalin on the formation of the gastrointestinal tract microbiota and some immunomorphochemical indicators of the blood of young roccoon dog (*Nuclereutes procyonoides* grey). Scientific research of the SCO countries: synergy and integration: Proceedings of the International Conference, Beijing, 13 yanvarya 2023 goda. Beijing: Infiniti, 2023;204-211.

20. Fredericq P. Reciprocal antibiotic actions in enteric bacteria. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Apr;142(7-8):543-5. (In French).

Информация о соавторах:

Скуднова Татьяна Александровна, магистр, лаборант-исследователь Научно-образовательного центра внедрения биотехнологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»

Комоско Владимир Геннадьевич, младший научный сотрудник Научно-образовательного центра внедрения биотехнологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»

Комоско Геннадий Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра внедрения биотехнологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»

Новикова Ольга Александровна, микробиолог Научно-образовательного центра внедрения биотехнологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»

Information about co-authors:

Tatiana A. Skudnova, Research Assistant, Scientific and Educational Center for the introduction of Biotechnologies, Vyatka State University

Vladimir G. Komosko, Junior Researcher, Scientific and Educational Center for the introduction of Biotechnologies, Vyatka State University

Gennady V. Komosko, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Scientific and Educational Center for the introduction of Biotechnologies, Vyatka State University

Olga A. Novikova, microbiologist, Scientific and Educational Center for the introduction of Biotechnologies, Vyatka State University

Оценка способности *Klebsiella pneumoniae* образовывать биопленку

С.В.Титова, А.С.Анисимова, Н.В.Аронова

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

Klebsiella pneumoniae является условно-патогенным микроорганизмом, который может вызывать заболевания человека. Образование биопленки является одним из факторов персистенции и вирулентности штаммов.

Цель работы – оценка способности классических и гипермукоидных вариантов штамма *K. pneumoniae* образовывать биопленку на абиотических субстратах в разных питательных средах.

Материалы и методы. Исследованы штаммы, выделенные от больных с внебольничной пневмонией, разных морфотипов: классические и гипермукоидные. Формирование биопленок изучали на разных абиотических субстратах (полистирол и стекло), питательных средах при разной исходной концентрации бактерий, согласно общепринятой и авторской методикам.

Результаты. Интенсивность прироста (ИП) бактериальных масс в первые сутки была на высоком уровне у штаммов всех морфотипов, что свидетельствовало об их способности размножаться в питательных средах – МПА и бульон LB) при температуре 37°C. ИП бактериальной массы в LB-бульоне был выше, чем в МПА однако это не повлияло на дальнейшее формирование биопленки. Адгезия к гидрофобным поверхностям (полистироловым лункам) и к гидрофильной поверхности стекла, формирование биопленки всех морфотипов штаммов *K. pneumoniae*, культивируемых в питательных бульонах, имела штаммовые различия. Все штаммы гипермукоидной группы сформировали биопленки в первые сутки.

Заключение. Штаммы *K. pneumoniae* гипермукоидной и классической группы способны формировать биопленки в высокопитательных средах, на гидрофильных и гидрофобных абиотических поверхностях в разные сроки. Внутри групп штаммы *K. pneumoniae* отличались по степени биопленкообразования, которая зависела от их исходных концентраций.

Ключевые слова: биопленка, *Klebsiella pneumoniae*, классический морфотип, гипермукоидный морфотип, абиотический субстрат

Для цитирования: Титова С.В., Анисимова А.С., Аронова Н.В. Оценка способности *Klebsiella pneumoniae* образовывать биопленку. Бактериология. 2024; 9(3): 83–91. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-83-91

Assessment of the ability of *Klebsiella pneumoniae* to form biofilm

S.V.Titova, A.S.Anisimova, N.V.Aronova

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

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic microorganism that can cause human disease. Biofilm formation is one of the factors of persistence and virulence of strains.

Aim – assessment of the ability of *K. pneumoniae* classical and hypermucooid strains to form a biofilm on abiotic substrates in different nutrient media.

Materials and methods. Strains isolated from patients with community-acquired pneumonia of different morphotypes were studied: classical and hypermucooid. The formation of biofilms was studied on different abiotic substrates (polystyrene and glass), nutrient media at different initial concentrations of bacteria, according to generally accepted and proprietary methods.

Results. The growth rate (PI) of bacterial masses on the first day was at a high level in strains of all morphotypes, which indicated their ability to multiply in nutrient media (MPA and LB broth) at a temperature of 37°C. The PI of the bacterial mass in LB broth is higher than in MPA, but this did not affect the further formation of biofilm. Adhesion to hydrophobic surfaces (polystyrene wells) and to the hydrophilic surface of glasses, the formation of a biofilm of all morphotypes of *K. pneumoniae* strains cultivated in nutrient broths had strain differences. All strains of the hypermucooid group formed biofilms on the first day.

Conclusion. *K. pneumoniae* strains of the hypermucooid and classical groups are capable of forming biofilms in highly nutritious environments, on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces at different times. Within the groups, *K. pneumoniae* strains differed in the degree of biofilm formation, which depended on their initial concentrations.

Key words: biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, classical morphotype, hypermucooid morphotype, abiotic substrate

For citation: Titova S.V., Anisimova A.S., Aronova N.V. Assessment of the ability of *Klebsiella pneumoniae* to form biofilm. Bacteriology. 2024; 9(3): 83–91. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-83-91

Для корреспонденции:

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий 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
Телефон: +7 9034036869

Статья поступила 19.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

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

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: +7 9034036869

The article was received 19.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

Образование биопленок (БП) – одна из основных причин персистенции патогенных бактерий, вызывающих у человека тяжелые заболевания и вспышки внутрибольничных инфекций. Это универсальное свойство микроорганизмов является одним из факторов вирулентности, способствует колонизации живых тканей и медицинских изделий и обуславливает снижение чувствительности к противомикробным препаратам [1–3].

Klebsiella pneumoniae – вид грамотрицательных факультативно-анаэробных капсульных бактерий, относящийся к условно-патогенным микроорганизмам, которые могут играть важную роль в инфекционной патологии человека за счет способности вызывать заболевания в мочевыводящих и дыхательных путях, крови и мягких тканях, а также являться частой причиной внутрибольничных инфекций [4–7].

В научной литературе содержится информация о способности *K. pneumoniae* формировать БП как на абиотических поверхностях, например на медицинских устройствах и катетерах, так и на тканях человека [7–9]. В соответствии с фенотипическими и генотипическими характеристиками *K. pneumoniae* можно разделить на классические (сКР) и гипервирулентные (hvКР) морфотипы. Классическая форма может эволюционировать в гипервирулентную путем приобретения плазмиды, несущей гены устойчивости к карбапенемам [10] или гены гипервирулентности, в частности гены гипермуковязкого фенотипа (*rmpA* и *rmpA2*) [11]. Одним из факторов, способствующих образованию БП от начальной стадии адгезии до созревания, является полисахаридная капсула, которая может защищать бактерии от антимикробных соединений, повышая их вирулентные свойства [12]. Из всех существующих на данный момент способов самым простым и быстрым методом *in vitro* является изучение биопленкообразования бактерий на 96-луночном планшете. *K. pneumoniae* обычно образует БП на границе «жидкость – твердое тело», прикрепляясь ко дну лунки; массу БП оценивают после окрашивания кристаллическим фиолетовым [8, 13–17].

Цель работы – оценка способности штаммов *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных морфотипов образовывать биопленку на абиотических субстратах в разных питательных средах.

Материалы и методы

Исследованы 10 штаммов *K. pneumoniae*, выделенные от больных с внебольничной пневмонией в период 2021–2022 гг. на базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Культуры изолированы и идентифицированы с помощью комплексного подхода, включающего использование микробиологических и современных молекулярно-биологических методов – MALDI-TOF масс-спектрометрии.

По фенотипическому признаку (морфология колоний, стринг-тест, толщина капсулы) штаммы были разделены на группы классические и гипермукоидные. В классическую группу вошли 5 штаммов *K. pneumoniae* (K203, I7766, I9941, I7498, I7762кр), в группу гипермукоидных – также 5 штаммов (I9939, 9932, 6865, 7762р, 9537).

Формирование БП изучали на разных абиотических субстратах (полистирол и стекло), питательных средах при раз-

ной стартовой концентрации бактерий по ранее описанному методу, оценивая способность клеток холерных вибрионов к адгезии на полистироловой поверхности планшета с окрашиванием их генцианвиалетом [18]. Для адгезии использовали 96-луночные полистироловые планшеты с плоскодонными лунками. Суспензии готовили из суточных агаровых культур по отраслевому стандарту мутности Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86П) или измеряли с помощью прибора Densi-La-Meter. Далее с помощью последовательных 10-кратных разведений готовили взвеси культур в концентрациях 10^8 , 10^7 , 10^6 КОЕ/мл, вносили по 200 мкл в полистироловые лунки планшета, измеряли их оптическую плотность (ОП), величину которой принимали за стартовую. В качестве отрицательного контроля использовали лунки со стерильными питательными средами (мясопептонный бульон (МПБ) и бульон LB). Планшеты культивировали в условиях влажной камеры при 37°C в течение суток. Через 2, 4, 6, 20, 24 ч рост планктонной культуры оценивали на спектрофотометре MultiscanPlus при длине волны 620 нм и выражали в условных единицах ОП. Регистрировали ОП бактериальной суспензии в полистироловых лунках совместно с клетками, которые адгезировали на дне лунок. ОП бактериальной суспензии в физиологическом растворе использовали для сравнения способности микробных клеток размножаться в питательных средах. Оценивали интенсивность прироста (ИП) бактериальной суспензии по формуле [8]:

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{24} : \text{ОП}_0, \quad (1)$$

где ОП_{24} – оптическая плотность суспензии бактерий через 24 ч культивирования,

ОП_0 – исходная оптическая плотность.

Значения ИП в контрольных средах были равны ≤ 1 , в физиологическом растворе – стартовым величинам плотности культуры.

Значения ИП оценивали следующим образом: 1–2 – прирост отсутствовал, 2–3 – незначительный/сомнительный, ≥ 3 – высокий/значительный.

Для определения способности штаммов формировать БП сначала определяли контрольное значение оптической плотности (ОПК), за которое принимали минимальное значение ОП контрольных лунок, превышение которого можно интерпретировать как способность к формированию БП (степень биопленкообразования), по формуле [19]:

$$\text{ОПК} = M_{\text{cp}} (\text{ОП лунок контроля}) + 3 \times \sigma (\text{ОП лунок контроля}), \quad (2)$$

где M_{cp} – среднее арифметическое значение ОП контрольной лунки, σ – среднее квадратичное (стандартное) отклонение контрольных значений.

На основании полученных на спектрофотометре данных для каждого штамма рассчитывали среднее арифметическое значение ОП. Оценивали степень биопленкообразования по значениям ОП окрашенного растворителя (спирт), согласно [20]. При $\text{ОП} \geq 4$ ОПК биопленкообразование считали высоким; 2–4 ОПК – умеренным; ≤ 2 ОПК – низким; ≤ 1 ОПК – отсутствует.

Для изучения способности бактериальных клеток формировать БП на гидрофильной абиотической поверхности использовали стеклянные пробирки [21] и покровные стекла [22]. Для этого штаммы *K. pneumoniae* в исходной concentra-

ции 10^7 КОЕ/мл переносили в стеклянные пробирки с МПБ и оставляли на сутки в термостате при 37°C. Через сутки отбирали содержимое пробирок, промывали дистиллированной водой и заливали пробирки 1%-м раствором генцианвиолета (1 мл, 30 мин при комнатной температуре), далее промывали 2–3 раза дистиллированной водой. Учет производили качественно по визуальному признаку – синему кольцу на стенках стеклянных пробирок.

Адгезию клеток *K. pneumoniae* к поверхности покровных стекол и формированию БП наблюдали в динамике, используя методы световой и люминесцентной микроскопии [22]. Жизнеспособность планктонной и биопленочной форм *K. pneumoniae* учитывали по наличию роста на мясопептонном агаре (МПА). Для этого покровные стекла размещали в пенициллиновых флаконах (пенфлаконах), одно стекло на один пенфлакон, и вносили среды культивирования до полного их погружения. Через определенные промежутки времени вынимали стерильным пинцетом стекла из каждой пробы, промывали их забуференным физиологическим раствором (PBS) и в вертикальном положении помещали на листы фильтровальной бумаги, расположенные в чашке Петри, для удаления с их поверхности оставшейся жидкости. После этого стекла накладывали на поверхность агара, отпечатывали с одной и другой стороны на агаровой пластине, оставляли в термостате при 37°C и на следующие сутки регистрировали наличие роста колоний. Второе стекло помещали на предметное стекло, добавляли раствор акридинового оранжевого в концентрации 20 мкг/мл (прижизненное флуорохромирование), накрывали покровным стеклом большего размера и исследовали методом люминесцентной микроскопии. Для световой микроскопии использовали фикси-

рованные микропрепараты с двойным окрашиванием Конго красным в течение 15 мин, затем фуксином – 10 мин [23].

Способность штаммов формировать БП изучали на разных средах: МПБ, бульон LB, в качестве сравнения использовали PBS.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ выполняли с использованием программы Medstatistica.ru. Полученные данные объединяли в вариационные ряды, на основании которых проводили расчет средних арифметических величин (M). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (σ) и относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации, CV). Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью критерия Стьюдента, при уровне значимости $p \leq 0,05$ достоверность считали значимой.

Результаты исследования

Все исследуемые штаммы классической и гипермукоидной групп обладали хорошим ростом, что отражалось в значениях ОП как показателя количества клеток за сутки культивирования в испытуемых питательных средах (табл. 1, 2). Концентрация клеток *K. pneumoniae* в группе классических штаммов, культивируемых в МПБ, колебалась в пределах ОП 0,53–0,92, в группе гипермукоидных показатель ОП варьировал от 0,54 до 0,67. При культивировании классических штаммов в бульоне LB показатель ОП находился в диапазоне 0,51–0,96, гипермукоидных – 0,57–0,99. Несмотря на полученные разные значения ОП, что наглядно изображено на рис. 1, 2, статистически не подтверждено этого различия

Таблица 1. Средняя концентрация клеток *K. pneumoniae* в питательной среде МПБ
 Table 1. Average concentration of *K. pneumoniae* cells in the nutrient medium – MPB

Время, ч/ Time, h	№№ штаммов / strains										
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	КПср
	Классические / Classic					Гипермукоидные / Hypermucooid					
	Средняя концентрация клеток <i>K. pneumoniae</i> в планктонном состоянии и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$, м.к./мл) / Average concentration of <i>K. pneumoniae</i> cells in the planktonic state and standard deviation ($M \pm \sigma$, m.c./ml)										
0	0,09 ± 0,0	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02
24	0,71 ± 0,12	0,53 ± 0,0	0,92 ± 0,02	0,62 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,63 ± 0,08	0,57 ± 0,05	0,54 ± 0,02	0,62 ± 0,06	0,67 ± 0,01	0,07 ± 0,0
Σ	M = 0,74 ± 0,18; CV = 23,81%; m = 0,09					M = 0,61 ± 0,05; CV = 8,46%; m = 0,03					
	Значение t-критерия Стьюдента: 1,37 / Student's t-test value: 1.37 Различия статистически не значимы ($p = 0,212914$) / The differences are not statistically significant ($p = 0.212914$)										
В табл. 1 и 2 исходное значение соответствует показателю «время 0». / In tables 1 and 2, the initial value corresponds to the "time 0" indicator.											

Таблица 2. Средняя концентрация *K. pneumoniae* разных штаммов в бульоне LB
 Table 2. Average concentration of *K. pneumoniae* of different strains in LB broth

Время, ч/ Time, h	№№ штаммов / strains										
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	КПср
	Средняя концентрация клеток <i>K. pneumoniae</i> в планктонном состоянии и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$, м.к./мл) / Average concentration of <i>K. pneumoniae</i> cells in the planktonic state and standard deviation ($M \pm \sigma$, m.c./ml)										
0	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,0	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,0
24	0,86 ± 0,05	0,51 ± 0,03	0,74 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,96 ± 0,02	0,63 ± 0,06	0,99 ± 0,03	0,57 ± 0,02	0,76 ± 0,12	0,74 ± 0,04	0,05 ± 0,0
Σ	0,73 ± 0,19; 26,05%; m = 0,09					0,74 ± 0,16; 21,05%; m = 0,08					
	Значение t-критерия Стьюдента: 0,08 / Student's t-test value: 0,08 Различия статистически не значимы ($p = 0,936140$) / The differences are not statistically significant ($p = 0,936140$)										

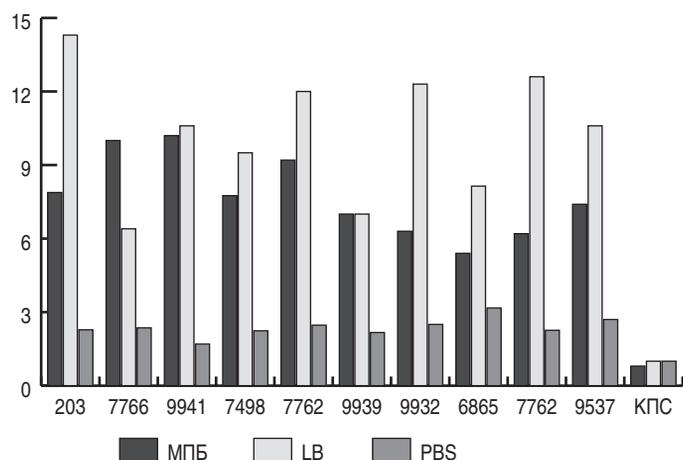


Рис. 1. Показатель интенсивности прироста микробных клеток штаммов *K. pneumoniae*: КПС – контроль питательной среды; по оси абсцисс – №№ штаммов; по оси ординат – значения показателя ИП.

Fig. 1. The growth rate of microbial cells of *K. pneumoniae* strains: KPS – control of the nutrient medium; along the abscissa axis – strain numbers; along the ordinate axis – the values of the IP indicator.

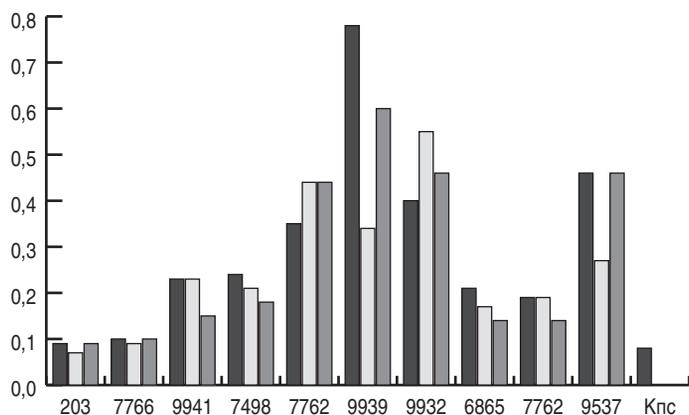


Рис. 2. Зависимость биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* от стартовой концентрации: ■ – 10^6 КОЕ/мл; □ – 10^7 КОЕ/мл; ▒ – 10^8 КОЕ/мл; КПС – контроль; по оси абсцисс – № штаммов; по оси ординат – ОП биопленкообразования.

Fig. 2. Dependence of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains on the starting concentration: ■ – 10^6 CFU/ml; □ – 10^7 CFU/ml; ▒ – 10^8 CFU/ml; KPS – control; along the abscissa axis – No of strains; along the ordinate axis – OD of biofilm formation.

при культивировании в МПБ ($p = 0,212914$) и в бульоне LB ($p = 0,936140$). Концентрация клеток *K. pneumoniae* всех штаммов, независимо от групповой принадлежности, значительно превышала их исходное значение, что свидетельствовало о высокой способности к размножению.

Интенсивность прироста клеток *K. pneumoniae*, взятых в исходной концентрации 10^7 КОЕ/мл, в испытуемых средах определяли согласно формуле 1, показатель ИП микробных клеток классических и гипермукоидных штаммов, культивируемых в бульоне LB, в 7 пробах был выше, чем показатель ИП в МПБ, и значительно превышал показатель в PBS.

Согласно результатам, представленным на рис. 1, ИП микробных клеток *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных штаммов, взятых в эксперимент, за сутки культивирования в исследуемых питательных средах была значительной, т.е., согласно формуле (2), значение показателя ИП бактериальной суспензии клеток было выше трех установленных для штаммов обоих морфовариантов, культивируемых в МПБ и бульоне LB, что подтверждается статистической достоверностью ($p \leq 0,05$). Обращает на себя внимание показатель ИП у 7 штаммов из 10, который на бульоне LB был выше, чем на МПБ, однако при сравнении показателя ИП между двумя группами штаммов связь была статистически не значимой, следовательно, нет преимущества в выборе питательных сред между МПБ и бульоном LB при культивировании штаммов *K. pneumoniae*. Поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали МПБ.

В следующих экспериментах было изучено биопленкообразование классических и гипермукоидных морфовариантов клебсиелл в зависимости от их исходных концентраций с использованием среды МПБ. Результаты представлены на рис. 2, оценка степени биопленкообразования – в табл. 3.

При сравнении суммарных результатов ОП клеток *K. pneumoniae* в биопленочной форме классических и гипермукоидных штаммов в одинаковых исходных концентрациях при культивировании в МПБ статистически достоверных различий не выявлено ($p \geq 0,05$). Значимая связь ($p \leq 0,05$) установлена между отдельными штаммами внутри самих групп (*K. pneumoniae* 203 и 7762кр или 9932 и 7762р).

Оценку степени биопленкообразования проводили согласно формуле 2, где превышение значений ОПК – это способность к биопленкообразованию [12]. Результаты представлены в табл. 3. Через сутки культивирования в МПБ классических и гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* взятых в разных исходных концентрациях (10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ/мл), определяли ОП. Полученные результаты свидетельствуют о межштаммовых различиях.

Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что из пяти штаммов *K. pneumoniae* классической группы у двух (203 и 7766) вне зависимости от их исходных концентраций биопленкообразование в первые сутки не происходило. У трех штаммов (7762кр, 9941, 7498) степень биопленкообра-

Таблица 3. Оценка степени биопленкообразования штаммов <i>K. pneumoniae</i> при их исходных концентрациях: 10^6 , 10^7 и 10^8 КОЕ/мл											
Table 3. Assessment of the degree of biofilm formation of <i>K. pneumoniae</i> strains at their initial concentrations: 10^6 , 10^7 and 10^8 CFU/ml											
Стартовая концентрация, КОЕ/мл / Starting concentration, CFU/ml	№№ штаммов / strains										
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	КПС
	Классические / Classical					Гипермукоидные / Hypermucooid					
10^6	0	0	У	У	У	З	У	Н	Н	З	0
10^7	0	0	У	Н	У	У	З	Н	Н	У	
10^8	0	0	Н	Н	У	З	З	Н	Н	З	

КПС – контроль питательной среды; 0 – отсутствует; У – умеренная; З – значительная; Н – низкая. / KPS – nutrient medium control; 0 – absent; У – moderate; З – significant; Н – low.

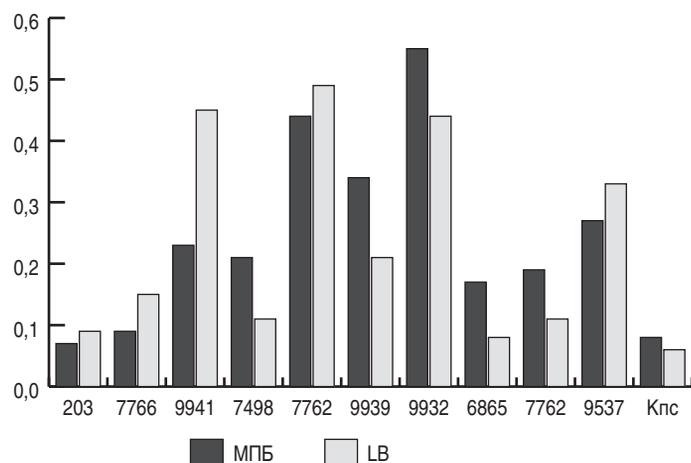


Рис. 3. Степень биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* в разных питательных средах: КПС – контроль питательной среды; по оси абсцисс – № штамма; по оси ординат – ОП биопленкообразования.

Fig. 3. Degree of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains in different nutrient media: KPS – nutrient medium control; abscissa axis – strain number; ordinate axis – OD of biofilm formation.

зования согласно формуле 2 характеризовалась умеренными значениями в зависимости от исходной концентрации. Так, у штамма *K. pneumoniae* 7762кр при всех изученных концентрациях и у штамма 9941 при концентрации 10^6 и 10^7 степень биопленкообразования была умеренной, а при 10^8 КОЕ/мл – низкой; у штамма 7498 при концентрации 10^6 КОЕ/мл – умеренной, при 10^7 и 10^8 КОЕ/мл – низкой. В группе гипермукоидных все 5 штаммов в течение первых суток прикреплялись ко дну лунки. Формирование БП зависело от начальной концентрации: так, значительная степень биопленкообразования была у штамма 9939 при стартовых концентрациях 10^6 и 10^8 , умеренная – при 10^7 КОЕ/мл; у штамма 9932 – значительная степень биопленкообразования при 10^7 и 10^8 КОЕ/мл, умеренная – при 10^6 , у штамма

9537 значительная степень биопленкообразования при 10^6 и 10^8 и умеренная – при 10^7 КОЕ/мл. В то же время у двух гипермукоидных штаммов (6865, 7762р) при всех изучаемых стартовых концентрациях зарегистрирована низкая степень формирования БП. Обращает на себя внимание тот факт, что при максимальной посевной дозе 10^8 КОЕ/мл показатели степени биопленкообразования у штаммов не превышали значения в пробах, где использовали меньшие посевные дозы.

На следующем этапе было изучено влияние разных питательных сред на биопленкообразование штаммов *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных групп (10^7 КОЕ/мл). Результаты представлены на рис. 3 и в табл. 4.

При сравнении результатов ОП БП бактерий классической и гипермукоидных групп между собой при их культивировании в бульоне LB и МПБ статистически достоверных различий не выявлено, несмотря на высокую ИП бактериальных клеток в бульоне LB. При культивировании *K. pneumoniae* в МПБ выявлены штаммы внутри гипермукоидной группы с высокой биопленкообразующей способностью, подтвержденной значимой связью ($p \leq 0,05$), а в классической группе отличий в формировании БП у штаммов не было ($p \geq 0,05$).

В табл. 4 приведена оценочная градация степени биопленкообразования.

Согласно расчетам, проведенным по формуле 2, где превышение ОГК интерпретируется как способность к формированию биопленки, через 1 сутки культивирования в разных питательных средах определены штаммовые различия *K. pneumoniae* по степени биопленкообразования в каждой группе. В классической группе у штамма *K. pneumoniae* 203 формирование БП отсутствовало во всех питательных средах. У штамма 7766 формирование БП в низкой степени было при культивировании в бульоне LB и отсутствовало при использовании МПБ. У штамма 7498 в двух средах биопленкообразование было в низкой степени. Два штамма – 9941 и

Таблица 4. Оценка степени биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* в разных питательных средах
Table 4. Evaluation of the degree of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains in different nutrient media

ПС	№№ штаммов / strains										КПС
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	
	Классические / Classical					Гипермукоидные / Hypermucoid					
МПБ	О	О	У	Н	З	У	З	Н	Н	У	О
LB	О	Н	З	Н	З	У	З	О	Н	У	О

ПС – питательные среды; КПС – контроль питательной среды; О – отсутствует; У – умеренная; З – значительная; Н – низкая. / PS – nutrient media; KPS – nutrient medium control; O – absent; Y – moderate; Z – significant; H – low.

Таблица 5. Качественная (визуальная) оценка степени биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae*
Table 5. Qualitative (visual) assessment of the degree of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains

Стартовая концентрация, КОЕ/мл / Starting concentration, CFU ml	Биопленкообразование на разделе фаз / Biofilm formation at phase separation	№№ штаммов / strains									
		203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537
		Классические / Classical					Гипермукоидные / Hypermucoid				
10^6	кольцо / ring	-	+	++++	+/-	++++	++++	++++	++++	+/-	+/-
10^7	кольцо / ring	+/-	+	++++	+	+	++++	++++	++++	+	+/-
10^8	кольцо / ring	+	+	++++	-	++++	++++	++++	++++	+	++++

++++ – четкое кольцо на разделе фаз жидкость/воздух; + – тонкое кольцо на разделе фаз; +/- – кольцо не четкое; -- отсутствие кольца. / ++++ – clear ring at the liquid/air phase boundary; + – thin ring at the phase boundary; +/- – the ring is not clear; -- no ring.

Таблица 6. Характеристика штаммов *K. pneumoniae* разных морфотипов по степени интенсивности прироста микробных клеток и степени биопленкообразования
 Table 6. Characteristics of *K. pneumoniae* strains of different morphotypes according to the intensity of microbial cell growth and the degree of biofilm formation

Показатель / Index	Градация / Gradation	Доля штаммов / Proportion of strains, %			
		классические / classic		гипермукоидные / hypermucoid	
		МПБ	LB	МПБ	LB
Интенсивность прироста / Growth rate	отсутствует / absent	0	0	0	0
	слабая / weak	0	0	0	0
	значительная / significant	100	100	100	100
Степень биопленкообразования / Degree of biofilm formation	отсутствует / absent	40	20	0	20
	слабое / низкое weak / low	20	40	40	20
	умеренное / moderate	20	0	40	40
	значительное / significant	20	40	20	20
Четкое кольцо на стеклянный стенках / Clear ring on glass walls	++++	40	нд	80	нд

нд – нет данных. / nd – no data.

7498 – проявили умеренную и значительную степени биопленкообразования в МПБ и бульоне LB соответственно.

В группе гипермукоидных штаммов биопленкообразование в низкой степени в двух средах было у штаммов 7762p и 6865, у последнего – отсутствовало в бульоне LB, в умеренной степени – у двух штаммов 9939 и 9537 и в значительной – у штамма 9932.

С помощью качественного метода (образования кольца на стенках стеклянных пробирок) при культивировании в МПБ исследована способность к формированию БП на разделе фаз жидкость/воздух и адгезии на гидрофильных поверхностях. Полученные данные подтвердили результаты вышеописанного эксперимента о штаммовой гетерогенности по биопленкообразующей способности. Результаты адгезии клеток к стенкам гидрофильной поверхности представлены в табл. 5.

Из результатов, представленных в табл. 5, видно, что штаммы *K. pneumoniae* классической и гипермукоидной групп способны к формированию БП на гидрофильных поверхностях. Если в классической группе из пяти штаммов только у двух было сформировано четкое кольцо, то в группе гипермукоидных штаммов четкое кольцо сформировалось у четырех штаммов при исходной концентрации 10^8 КОЕ/мл. Нами было отмечено, что у штамма 9537 при 10^8 КОЕ/мл и при других стартовых концентрациях отмечалось только окрашивание стенок пробирок или тонкое кольцо.

Все представленные выше результаты экспериментов по ИП микробных клеток и формированию БП в питательных средах выражены в процентном выражении, анализ данных представлен в табл. 6, где за 100% было принято общее количество штаммов каждой группы.

По результатам, представленным в табл. 6, показано 100%-е увеличение количества микробных клеток через сутки у всех исследуемых штаммов при культивировании в бульонных средах. ИП в PBS всех исследуемых штаммов оставалась на уровне исходных значений. Формирование БП учитывали на питательных средах в течение первых суток. В 20% случаев адгезия клеток *K. pneumoniae* обоих морфотипов при культивировании в бульоне LB не происхо-

дила. В 40% случаев у штаммов классической группы отсутствовала адгезия клеток ко дну полистироловой лунки при культивировании в МПБ; напротив, все штаммы гипермукоидной группы адгезировались и образовали выраженную в той или иной степени БП.

Штаммы классической группы проявляли низкую степень биопленкообразования: на МПБ – в 20% случаев, на бульоне LB – в 40%, в гипермукоидной группе – в 40 и 20% случаев соответственно. Умеренная степень биопленкообразования была у штаммов гипермукоидной группы в 40% случаев на МПБ и бульоне LB и только в 20% случаев у штаммов классической группы на МПБ. Степень биопленкообразования в 40% случаев была значительно выражена у штаммов классической и в 20% – гипермукоидной групп при культивировании в бульоне LB и по 20% – в МПБ.

В качественной реакции «образование кольца на стеклянной поверхности пробирки» при культивировании в МПБ оно четко регистрировалось у 80% штаммов гипермукоидной группы и у 40% классической группы.

Для изучения формирования БП в динамике при температуре 37°C мы использовали покровные стекла, среда культивирования – МПБ. В качестве модели использовали штаммы разных морфотипов, а именно *K. pneumoniae* K203 классической группы, который при культивировании в МПБ и бульоне LB в лунках полистиролового планшета через сутки не формировал БП, и штамм *K. pneumoniae* I9939 гипермукоидной группы, который через сутки сформировал биопленку в умеренной степени при культивировании в МПБ и бульоне LB.

По результатам бактериологического исследования – отпечатывания БП на пластинке МПА – через двое суток отмечали типичный сливной рост культур двух штаммов разных морфотипов. На рис. 4 представлены микропрепараты БП, образованных на покровных стеклах двух штаммов. Витальные микроскопические препараты состояли из подвижных клеток, конгломератов клеток разных размеров зеленого цвета, которые наслаивались друг на друга во всех полях зрения. При использовании световой микроскопии методом двойного окрашивания были обнаружены клетки

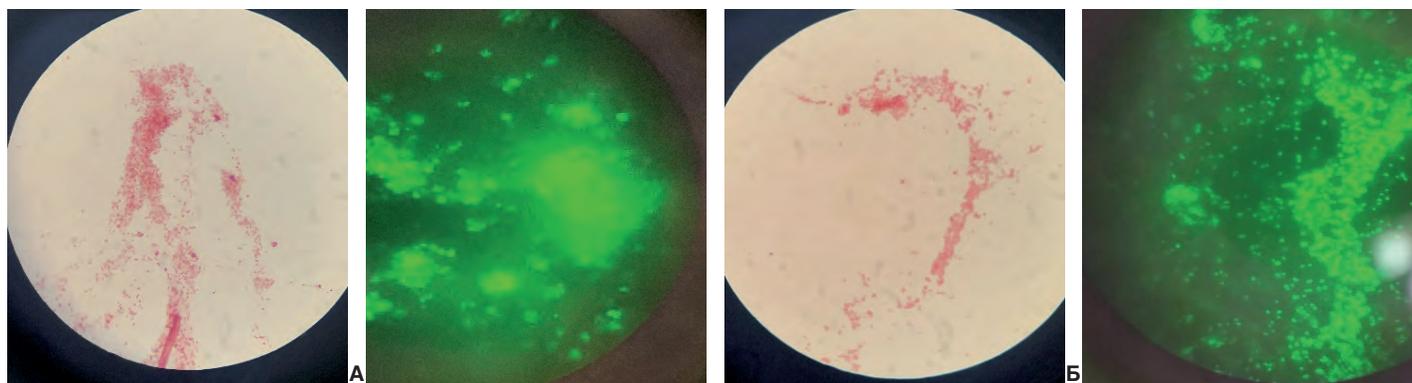


Рис. 4. Микропрепараты штаммов *K. pneumoniae* двух морфотипов: А – биопленка *K. pneumoniae* K203, классический морфотип, Б – биопленка *K. pneumoniae* I9939, гипермукоидный морфотип. Слева – окрашивание конго красным и фуксином, увеличение 70×90 ; справа – окрашивание акридиновым оранжевым, увеличение 10×90 .

Fig. 4. Microscopic slides of *K. pneumoniae* strains of two morphotypes: А – biofilm of *K. pneumoniae* K203, classical morphotype, Б – biofilm of *K. pneumoniae* I9939, hypermucoid morphotype. Left – staining with Congo red and fuchsin, magnification 70×90 ; right – staining with acridine orange, magnification 10×90 .

красного цвета, по форме палочки, расположенные одиночно, малыми или большими конгломератами, между красных клеток просматривался розового цвета экзополисахарид, т.е. были все признаки сформировавшейся БП [22].

Обсуждение

Высокий уровень ИП микробных клеток в первые сутки культивирования свидетельствует о способности штаммов *K. pneumoniae* разных морфотипов размножаться в питательных средах (МПА и бульон LB) на полистироловых лунках при температуре 37°C . При этом ИП микробных клеток восьми штаммов из двух морфотипов выше при культивировании в бульоне LB. При сравнении суммарных результатов динамики ИП в виде увеличения концентрации *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных штаммов в планктонных формах при культивировании в бульоне LB и МПБ к ОП контрольных сред выявлены статистически значимые различия ($p \leq 0,05$).

При сравнении результатов образования БП штаммов *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных групп, изначально взятых в разных стартовых концентрациях, при культивировании в МПБ статистически подтвержденных различий не выявлено. Можно предположить, что размножение *K. pneumoniae* во всех пробах происходило с разной интенсивностью. Очевидно, что в пробах с исходной концентрацией 10^6 КОЕ/мл микробные клетки размножались интенсивнее. Возможно, в пробах с исходной концентрацией 10^8 КОЕ/мл из-за размножившейся культуры в среде культивирования популяция клеток стала уплотняться и отмирать.

При сравнении суммарных результатов концентрации *K. pneumoniae* в биопленочной форме классических и гипермукоидных штаммов в одинаковых исходных концентрациях при культивировании в МПБ статистически подтвержденных различий не выявлено. Нами сделано предположение, что формирование БП при выращивании в условиях МПБ при температуре 37°C через 1–2 суток культивирования проходило одинаково независимо от фенотипической принадлежности штамма. Значимая связь ($p \leq 0,05$) проявлялась между штаммами внутри самих групп.

Адгезия бактериальных клеток и формирование БП всех морфотипов штаммов *K. pneumoniae*, культивируемых в питательных бульонах, к полистироловым плоскодонным лункам 96-луночного планшета имели штаммовые различия в каждой группе. Аналогичным образом штаммовая гетерогенность отмечена и в отношении способности к формированию БП на разделе фаз жидкость/воздух и к адгезии на гидрофильных поверхностях.

При формировании БП в динамичных условиях при культивировании в МПБ на примере двух штаммов *K. pneumoniae* (K203, I9939) из разных групп отмечено, что адгезия клеток к покровным стеклам началась с первого дня, о чем свидетельствуют данные микропрепаратов и рост клеток на МПА. Возможно, большая часть популяции клеток находилась в планктонной форме и уже ко второму дню происходило формирование БП. При витальной микроскопии на вторые сутки отмечено наслаивание клеток, формирование матрикса БП, что было также подтверждено розовым окрашиванием в фиксированных микропрепаратах. Возможно, слизеобразная субстанция у гипермукоидного штамма *K. pneumoniae* не обеспечила ему четкой фиксации к стеклу и отмылась во время приготовления препарата. Интересно отметить работу Zheng et al. (2018), где фенотип повышенной слизистой вязкости – общий признак бактериемии *K. pneumoniae* – не был связан с повышенным образованием БП у этих штаммов [24].

Заключение

Для объективной оценки способности разных штаммов *K. pneumoniae* к биопленкообразованию необходимо использовать разные методы. Штаммы *K. pneumoniae* гипермукоидной и классической группы способны формировать БП в высокопитательных средах, на гидрофильных и гидрофобных абиотических поверхностях в разные сроки. Несмотря на более высокий ИП бактериальной массы в бульоне LB, чем в МПБ, образование БП происходило идентично, но степень биопленкообразования имела отличия, все штаммы гипермукоидной группы сформировали БП в первые сутки на МПБ. Внутри групп штаммы *K. pneumoniae* отличались по степени биопленкообразования, которая зависела от их

стартовых концентраций. Известно, что *K. pneumoniae* способна вызывать тяжелые заболевания, приобретать устойчивость к антибактериальным и дезинфицирующим препаратам зачастую благодаря своей биопленкообразующей способности, поэтому необходимо продолжать исследования по изучению условий формирования и разрушения биопленок разных морфотипов *K. pneumoniae*.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Шипицына ИВ, Осипова ЕВ. Влияние дезинфицирующих средств на рост биопленки, образованной штаммами *K. pneumoniae*. Медицинский алфавит. 2022;35:37-41. DOI: 10.33667/2078-5631-2022-35-37-41
- Алешукина АВ, Голошва ЕВ, Твердохлебова ТИ. Исследование влияния дезинфицирующих средств на биопленкообразующие неферментирующие бактерии. Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2020;1(205):89-94. DOI: 10.18522/1026-2237-2020-1-89-94
- Дятлов ИА, Детушева ЕВ, Мицевич ИП, Детушев КВ, Подкопаев ЯВ, Фурсова НК. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций. Бактериология. 2017;2(2):48-58. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-48-58
- Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med. 2014 Mar 27;370(13):1198-208. DOI: 10.1056/NEJMoa1306801
- Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults. Microb Drug Resist. 2018 Sep;24(7):949-957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
- Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jan 22;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
- 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. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19
- Савилов ЕД, Маркова ЮА, Немченко УМ, Носкова ОА, Чемезова НН, Кунгурцева ЕА, и др. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. Тихоокеанский медицинский журнал. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35
- Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2022 May 11;12:877995. DOI: 10.3389/fcimb.2022.877995
- He J, Du X, Zeng X, Moran RA, van Schaik W, Zou Q, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of a Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST17-KL38 Clinical Isolate Harboring the Carbapenemase IMP-4. Microbiol Spectr. 2022 Apr 27;10(2):e0213421. DOI: 10.1128/spectrum.02134-21
- Chen Y, Chen Y. Clinical Challenges with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) in China. J Transl Int Med. 2021 Jan 5;9(2):71-75. DOI: 10.2478/jtim-2021-0004
- Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019 May 15;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
- Singh AK, Yadav S, Chauhan BS, Nandy N, Singh R, Neogi K, et al. Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their *in vitro* Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry With Special Reference to the Protein Content. Front Microbiol. 2019 Apr 4;10:669. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00669
- Chen L, Wilksch JJ, Liu H, Zhang X, Torres VVL, Bi W, et al. Investigation of LuxS-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol. 2020 Mar;69(3):402-413. DOI: 10.1099/jmm.0.001148
- Townsend EM, Moat J, Jameson E. CAUTI's next top model – Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials. Biofilm. 2020 Dec;2:100038. DOI: 10.1016/j.biofilm.2020.100038
- Pacheco T, Gomes AÉ, Siqueira NMG, Assoni L, Darrieux M, Venter H, et al. SdiA, a Quorum-Sensing Regulator, Suppresses Fimbriae Expression, Biofilm Formation, and Quorum-Sensing Signaling Molecules Production in *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2021 Jun 21;12:597735. DOI: 10.3389/fmicb.2021.597735
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998 May;28(3):449-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- 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
- Ярец ЮИ, Шевченко НИ. Новый метод анализа бактериальной биопленки. Наука и инновации. 2016;11(165):64-68.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Романова ЮМ, Алексеева НВ, Смирнова ТА, Андреев АЛ, Диденко ЛВ, Гинцбург АЛ. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;4:38-42.
- Титова СВ, Веркина ЛМ. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241
- 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.
- Zheng JX, Lin ZW, Chen C, Chen Z, Lin FJ, Wu Y, et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of wcaG. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Feb 23;8:21. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00021

References

- Shipitsyna IV, Osipova EV. Influence of disinfectants on growth of biofilm formed by *K. pneumoniae* strains. Medical Alphabet. 2022;35:37-41. DOI: 10.33667/2078-5631-2022-35-37-41 (In Russian).
- Aleshukina AV, Goloshva EV, Tverdokhlebova TI. Investigation of the effect of disinfectants on biofilm forming non-fermenting bacteria. Bulletin Of Higher Education Institutes. North Caucasus Region. Natural Sciences. 2020;1(205):89-94. DOI: 10.18522/1026-2237-2020-1-89-94 (In Russian).
- Dyatlov IA, Detusheva EV, Mitsevich IP, Detushev KV, Podkopaev YaV, Fursova NK. Sensitivity and formation of stability to antiseptics and disinfectants in hospital infections. Bacteriology. 2017;2(2):48-58. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-48-58 (In Russian).

4. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014 Mar 27;370(13):1198-208. DOI: 10.1056/NEJMoa1306801
5. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults. *Microb Drug Resist*. 2018 Sep;24(7):949-957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
6. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Jan 22;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
7. Chebotar IV, Bocharova YuA, Podoprigora 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).
8. Savilov ED, Markova YA, Nemchenko UM, Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, et al. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Pacific Medical Journal*. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35 (In Russian).
9. Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 11;12:877995. DOI: 10.3389/fcimb.2022.877995
10. He J, Du X, Zeng X, Moran RA, van Schaik W, Zou Q, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of a Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST17-KL38 Clinical Isolate Harboring the Carbapenemase IMP-4. *Microbiol Spectr*. 2022 Apr 27;10(2):e0213421. DOI: 10.1128/spectrum.02134-21
11. Chen Y, Chen Y. Clinical Challenges with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) in China. *J Transl Int Med*. 2021 Jan 5;9(2):71-75. DOI: 10.2478/jtim-2021-0004
12. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019 May 15;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
13. Singh AK, Yadav S, Chauhan BS, Nandy N, Singh R, Neogi K, et al. Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their *in vitro* Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry With Special Reference to the Protein Content. *Front Microbiol*. 2019 Apr 4;10:669. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00669
14. Chen L, Wilksch JJ, Liu H, Zhang X, Torres VVL, Bi W, et al. Investigation of LuxS-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2020 Mar;69(3):402-413. DOI: 10.1099/jmm.0.001148
15. Townsend EM, Moat J, Jameson E. CAUTI's next top model – Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials. *Biofilm*. 2020 Dec;2:100038. DOI: 10.1016/j.biofilm.2020.100038
16. Pacheco T, Gomes AÉI, Siqueira NMG, Assoni L, Darrieux M, Venter H, et al. SdiA, a Quorum-Sensing Regulator, Suppresses Fimbriae Expression, Biofilm Formation, and Quorum-Sensing Signaling Molecules Production in *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2021 Jun 21;12:597735. DOI: 10.3389/fmicb.2021.597735
17. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998 May;28(3):449-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
18. 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
19. Yarets Yul, Shauchenka NI. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *The Science and Innovations*. 2016;11(165):64-68. (In Russian).
20. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
21. Romanova YuM, Alekseeva NV, Smirnova TA, Andreev AL, Didenko LV, Gintsburg AL. Biofilm formation by different strains of *Salmonella typhimurium* in artificial systems. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2006;4:38-42. (In Russian).
22. Titova SV, Verkina LM. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241 (In Russian).
23. 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).
24. Zheng JX, Lin ZW, Chen C, Chen Z, Lin FJ, Wu Y, et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of wcaG. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Feb 23;8:21. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00021

Информация о соавторах:

Анисимова Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Аронова Надежда Валентиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Anastasia S. Anisimova, Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Nadezhda V. Aronova, PhD in Biological Sciences, leading researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Изучение антагонистических свойств пробиотических бактерий, выделенных в Узбекистане

З.О.Шарипова¹, Л.И.Абдульмянова², Н.Т.Ёдгорова³

¹Ташкентский НИИ вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Институт микробиологии Академии наук, Ташкент, Республика Узбекистан;

³Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан

Все большее количество научных исследований микробиоты кишечника подтверждают ее центральную роль в здоровье человека и развитии патологических состояний. Бифидо- и лактобактерии, являющиеся основой микробиоты и относящиеся к классу пробиотических микроорганизмов, несомненно важны для поддержания симбиотических отношений между организмом человека и кишечными микроорганизмами. Наиболее важным свойством пробиотических бактерий является обеспечение колонизационной резистентности – способности защищать стенки кишечника от проникновения патогенных бактерий и токсинов различного происхождения во внутреннюю среду. В комплексе этих механизмов не последнюю роль играет антагонистическая активность пробиотических культур.

В этой связи была изучена антагонистическая активность 11 штаммов местных лакто- и бифидобактерий, выделенных из фекалий новорожденных и материнского молока, по отношению к клиническим штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Штаммы *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* проявили наивысшую антагонистическую активность по отношению ко всем референс-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Наиболее чувствительными бактериями по антагонистической активности к лакто- и бифидобактериям оказались микроорганизмы рода *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* и *Candida albicans*.

Ключевые слова: микробиоценоз кишечника, иммунитет, пробиотики, бифидобактерии, лактобактерии, энтеробактерии, антагонистическая активность

Для цитирования: Шарипова З.О., Абдульмянова Л.И., Ёдгорова Н.Т. Изучение антагонистических свойств пробиотических бактерий, выделенных в Узбекистане. Бактериология. 2024; 9(3): 92–96. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-92-96

Study of the antagonistic properties of newly isolated local strains of probiotic bacteria in Uzbekistan

Z.O.Sharipova¹, L.I.Abdulmyanova², N.T.Yodgorova³

¹Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan Tashkent, Republic of Uzbekistan;

³Tashkent Medical Academy, Tashkent, Republic of Uzbekistan

An increasing number of scientific studies of the intestinal microbiota confirm its central role in human health and the development of pathological conditions. Bifidobacteria and lactobacilli, being the basis of the microbiota and belonging to the class of probiotic microorganisms, are undoubtedly important for maintaining the symbiotic relationship between the human body and intestinal microorganisms. The most important property of probiotic bacteria is the provision of colonization resistance – the ability to protect the intestinal walls from the penetration of pathogenic bacteria and toxins of various origins into the internal environment. In the complex of these mechanisms, the antagonistic activity of probiotic cultures plays an important role.

In this regard, the antagonistic activity of eleven strains of local lacto- and bifidobacteria isolated from the feces of newborns and mother's milk was studied in relation to clinical strains of pathogenic and opportunistic microorganisms. Strains of *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* showed the highest antagonistic activity against all reference strains of pathogenic and opportunistic microorganisms. The most sensitive bacteria in terms of antagonistic activity to lacto- and bifidobacteria were microorganisms of the genus *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* and *Candida albicans*.

Key words: intestinal microbiota, immunity, probiotics, bifidobacterium, lactobacillus, enterobacteria, antagonistic activity

For citation: Sharipova Z.O., Abdulmyanova L.I., Yodgorova N.T. Study of the antagonistic properties of newly isolated local strains of probiotic bacteria in Uzbekistan. Bacteriology. 2024; 9(3): 92–96. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-92-96

Для корреспонденции:

Шарипова Зияда Олимжон кизи, PhD докторант по специальности «Микробиология и вирусология» Ташкентского НИИ вакцин и сывороток
Адрес: 100084, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Чингиза Айтматова, 37
Статья поступила 13.05.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Ziyoda O. Sharipova, PhD doctoral candidate in specialization "Microbiology and virology", Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums
Address: 37 Chingiz Aitmatov str., Tashkent, 100084, Republic of Uzbekistan
The article was received 13.05.2024, accepted for publication 30.09.2024

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека содержит $>10^{14}$ клеток микроорганизмов, относящихся к более чем 1000 видов бактерий. Основное разнообразие видов находится в толстой кишке. У новорожденных в первые дни ЖКТ стерилен, колонизация его происходит на 3–4-е сутки. Тип кишечной колонизации, состав и количество кишечных микробов различны. Например, у новорожденных они зависят от способа родоразрешения (естественное или кесарево сечение), вида вскармливания (грудным молоком или искусственное вскармливание), географического положения уровня социально-экономического развития страны (развивающаяся или развитая) и т.д. [1], у взрослого человека – от возраста, физиологического состояния отделов ЖКТ, питания, режима питания и многих других подобных факторов. По оценкам специалистов, общая масса кишечной флоры у взрослых может достигать 1,5 кг. Доминирующее место в общей микробиологической популяции ЖКТ занимают две крупные группы бактерий: бифидобактерии и бактероиды, составляющие 90–95% от общего числа (иногда и больше). Бифидо- и лактобактерии, относящиеся к классу классических пробиотических микроорганизмов, играют важную роль в поддержании симбиотических отношений между организмом человека и кишечными микроорганизмами [2].

На протяжении всей жизни на макроорганизм действует целый комплекс внешних вредных факторов, негативно влияющих на нормальное функционирование основных систем его жизнедеятельности: экология, стресс, бесконтрольное применение антибиотиков. Вследствие этого постоянно возникают вопросы о способах конструирования и восстановления оптимальной микрофлоры организма хозяина. С этой целью в медицинскую практику охраны здоровья все больше внедряются бактериальные препараты, в большинстве случаев пробиотики на основе бифидо- и лактосодержащих бактерий – представителей облигатной и факультативной микрофлоры хозяина [3].

Все изученные к настоящему времени виды бифидобактерий (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* и *B. breve*) проявляют сильный антагонистический эффект в отношении патогенных и условно-патогенных возбу-

дителей, таких как *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*. Наибольшее ингибирующее действие показано на *S. aureus* и *Sh. sonnei*, вызывающих пищевые отравления преимущественно молочными продуктами. Результат антагонистического действия может проявляться в виде замедления, остановки или гибели исследуемой патогенной культуры. Антагонистическую активность бифидобактерий изучают как в отдельных штаммах, так и в комплексной форме. Показано, что увеличение видов используемых пробиотических культур приводит к усилению антагонистического эффекта в отношении возбудителей кишечных инфекций [2].

Другим важным пробиотическим компонентом микробиоты кишечника являются лактобациллы. Их положительные функции отмечаются в участии созревания иммунной системы организма, а также включают в себя конкуренцию и антагонизм по отношению к условно-патогенным микроорганизмам [4]. Лактосодержащие пробиотики назначаются при заболеваниях проксимальных отделов ЖКТ в связи с недостаточностью лактобактерий в этих отделах при их патологии. Применение лактосодержащих пробиотиков показано как при хронических гастроэнтерологических заболеваниях, так и при острых инфекционных гастроэнтеритах [5].

Наиболее важным свойством пробиотических бактерий является обеспечение колонизационной резистентности – способности защищать стенки кишечника от проникновения во внутреннюю стенку организма как патогенных бактерий, так и токсинов и токсических продуктов различного происхождения. В комплексе механизмов колонизационной резистентности важную роль играет антагонистическая активность пробиотических культур [5].

В этой связи целью данной работы было изучить антагонистическую активность 11 местных штаммов лакто- и бифидобактерий по отношению к клиническим штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Штаммы *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* проявили наивысшую ан-

Таблица. Антагонистическая активность пробиотических культур
 Table. Antagonistic activity of probiotic cultures

№	Штаммы микроорганизмов / Strains of microorganisms	Диаметр зоны задержки роста тест-культур, мм / Diameter of growth inhibition zone of test cultures, mm					
		<i>E. coli</i> n = 3	<i>S. enteritidis</i> n = 3	<i>P. mirabilis</i> n = 3	<i>S. aeruginosa</i> n = 3	<i>C. albicans</i> n = 3	<i>S. aureus</i> n = 3
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0	0	0	0	10 ± 0,6	15 ± 1
2	<i>Bifidobacterium lactis</i>	14 ± 0,6	12 ± 0,6	20 ± 0,4	16 ± 0,4	18 ± 1	20 ± 0,4
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20 ± 0,6	19 ± 0,4	25 ± 0,4	19 ± 0,6	20 ± 0,4	22 ± 0,4
4	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	20 ± 1	15 ± 0,4	25 ± 0,6	18 ± 0,4	21 ± 0,8	22 ± 1
5	<i>Lactobacillus zeae</i>	20 ± 0,4	15 ± 0,6	25 ± 0,4	18 ± 0,4	21 ± 0,6	22 ± 0,4
6	<i>Lactobacillus casei</i>	21 ± 0,6	16 ± 0,4	25 ± 0,4	16 ± 0,4	20 ± 1	21 ± 1,3
7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	11 ± 0,4	25 ± 0,4	16 ± 0,6	20 ± 0,4	25 ± 0,4
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	21 ± 0,8	11 ± 0,4	25 ± 0,4	0	20 ± 1	25 ± 0,6
9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12 ± 0,4	11 ± 0,4	25 ± 0,4	18 ± 0,4	0	25 ± 0,4
10	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	15 ± 0,6	11 ± 0,4	25 ± 0,6	0	0	25 ± 0,4
11	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	20 ± 0,3	0	0	25 ± 0,4



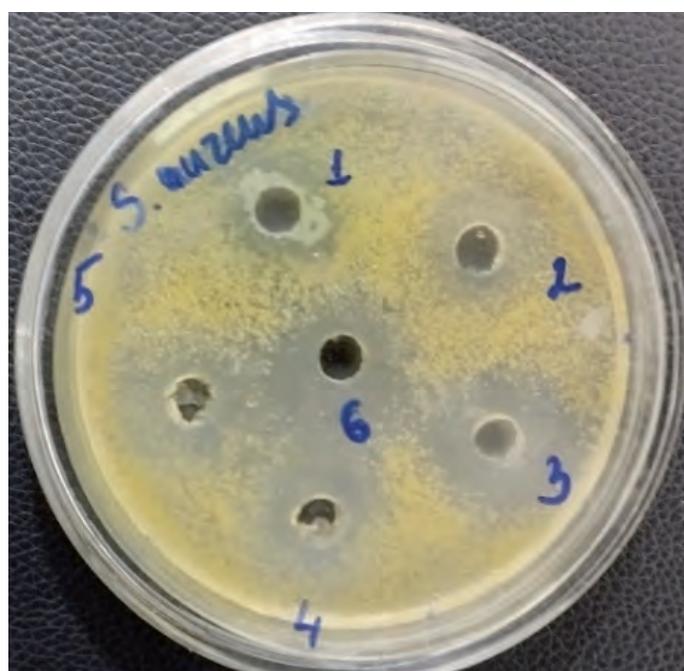
A) *Salmonella enteritidis*



B) *Proteus mirabilis*



C) *Pseudomonas aeruginosa*



D) *Staphylococcus aureus*

Рисунок. Антибактериальная активность пробиотических штаммов в отношении тест-культур: 1 – *B. bifidum*, 2 – *B. lactis*, 3 – *L. plantarum*, 4 – *L. bulgaricus*, 5 – *L. zaeae*, 6 – *L. casei* (A – *S. enteritidis*, B – *P. mirabilis*, C – *P. aeruginosa*, D – *S. aureus*).

Figure. Antibacterial activity of probiotic strains against test cultures: 1 – *B. bifidum*, 2 – *B. lactis*, 3 – *L. plantarum*, 4 – *L. bulgaricus*, 5 – *L. zaeae*, 6 – *L. casei* (A – *S. enteritidis*, B – *P. mirabilis*, C – *P. aeruginosa*, D – *S. aureus*).

тагонистическую активность по отношению к исследуемым референс-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили штаммы лакто- и бифидобактерий, выделенные из фекалий новорожденных и материнского молока. В ходе исследований использовались классические микробиологические и молекулярно-генетиче-

ские методы. Выделенные штаммы были идентифицированы с использованием генов 16S rRNA в сотрудничестве с «Микробиологической лабораторией» компании по производству пробиотиков BioMed Industry и лабораторией Ташкентской медицинской академии «Центр биомедицинских исследований».

Для исследования были отобраны штаммы *B. bifidum*, *B. lactis*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. zaeae*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Enterococcus faecium*. Антагонистическую

активность штаммов определяли диффузионно-луночным методом. В качестве тест-культур использовали *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *C. albicans*.

Пробиотические штаммы культивировали в бульоне Bifidum с 0,1%-м агаром и бульонной среде MSR в течение 24 ч. (HiMedia, производства Индия). Для тестирования пробиотических штаммов использовали мясопептонный агар (HiMedia, производство Индия) для бактерий. Чашки Петри с питательной средой инокулировали суточной суспензией тест-культуры в физиологическом растворе в концентрации $1 \cdot 10^6$, высушивали, в агаре вырезали лунки диаметром 5 мм и закапывали по 300 мкл исследуемых культур. Затем чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Полученные результаты учитывали путем измерения ингибирующих диаметров зоны роста тест-культуры вокруг лунок в мм.

Исследования проводили в трех чашках Петри с мясопептонным агаром. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики Фишера-Студента с определением стандартного отклонения и средней арифметической ошибки ($M \pm m$), критерия значимости различий (t). Статистическую обработку проводили на персональном компьютере с использованием программы Excel 2016.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе изучения антагонистических свойств пробиотических штаммов установлено, что все отобранные штаммы проявляют различную антагонистическую активность в отношении тест-культур (таблица). Наивысшую активность по отношению ко всем взятым в эксперимент референс-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проявили: *B. lactis*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. zeae*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*. При этом штаммы *S. aureus*, *C. albicans* и *P. mirabilis* проявили высокую чувствительность к тестируемым пробиотическим штаммам.

Исследованные условно-патогенные и патогенные микроорганизмы в основном вызывают у человека кишечные инфекции, диарею, внутрибольничные инфекции и оппортунистические заболевания. В частности, если учесть, что бактериями, вызывающими кишечные инфекции, являются *E. coli*, *P. mirabilis* и *S. enteritidis*, то пробиотический штамм, подавляющий *E. coli* с диаметром зоны $21 \pm 0,6$ мм – это *L. casei*, $21 \pm 0,8$ мм – *L. fermentum*, а с зоной лизиса $20 \pm 1,0$ мм и $20 \pm 0,4$ мм – штаммы *L. bulgaricus*, *L. zeae* соответственно.

Рост культуры *P. mirabilis*, вызывающей пищевое отравление, подавляли практически все штаммы пробиотиков. *L. bulgaricus* и *L. gallinarum* ингибировали рост на $25 \pm 0,6$ мм, а *L. plantarum*, *L. zeae*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* – на $25 \pm 0,4$ мм (рисунок).

С наименьшей активностью ингибировали рост тест-штаммов культуры *B. lactis* ($20 \pm 0,4$ мм) и *E. faecium* (до $20 \pm 0,3$ мм).

L. plantarum проявила антагонистическую активность в отношении возбудителя *S. enteritidis*, вызывающего сальмонеллез кишечника у детей раннего возраста и взрослых, останавливая его рост до $19 \pm 0,4$ мм.

Патогенные штаммы *S. aureus* и *P. aeruginosa* относятся к группе внутрибольничных инфекций и также вызывают

кишечные инфекционные заболевания. Установлено, что все отобранные штаммы пробиотиков проявляют антагонистическую активность в отношении золотистого стафилококка. В частности, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. gallinarum* и *E. faecium* подавляли зону роста возбудителя на $25 \pm 0,4$ мм. Было подтверждено, что *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. zeae* и *L. casei* являются активными штаммами с диаметром зоны подавления роста $22 \pm 1,0$; $22 \pm 0,4$; $22 \pm 0,4$ и $21 \pm 1,3$ мм соответственно.

В отношении *C. albicans*, условно-патогенной бактерии, вызывающей оппортунистические и кандидозные инфекционные заболевания, высокая антагонистическая активность в основном соответствовала вкладу лактобактерий. Установлено, что *L. bulgaricus*, *L. zeae* показали высокую активность против данного патогена, ингибируя рост на $21 \pm 0,8$ мм и $21 \pm 0,6$ мм, *B. lactis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* и *L. fermentum* одинаково ингибировали рост *C. albicans*. У *B. bifidum* зона подавления роста составила $15 \pm 0,1$ мм.

Заключение

Согласно данным, полученных в ходе проведенного нами эксперимента, установлено, что исследуемые пробиотические штаммы демонстрируют высокую антагонистическую активность к различным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. На основании полученных результатов можно сказать, что целенаправленное использование пробиотических микроорганизмов против патогенных инфекций может быть высокоэффективным. Так, применение различных комбинаций исследованных штаммов лакто- и бифидобактерий может оказывать эффективное воздействие на *P. mirabilis*, вызывающий пищевые токсикоинфекции. Таргетное использование штамма *L. plantarum* при сальмонеллезной инфекции может обеспечивать высокое антагонистическое действие в отношении возбудителя. При кишечных инфекциях, вызванных *S. aureus*, все вышеперечисленные штаммы пробиотиков могут быть использованы в качестве антагонистических препаратов. Штаммы лактобактерий *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. zeae*, *L. casei*, *L. paracasei* и *L. fermentum* могут быть рекомендованы для лечения кандидоза.

Таким образом, выделенные из фекалий новорожденных и материнского молока местные пробиотические штаммы лакто- и бифидобактерий обладают высокой антагонистической активностью и имеют перспективу использования в качестве компонента биотерапевтических препаратов для комплексной профилактики и терапии заболеваний ЖКТ бактериальной этиологии.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Шарипова ЗО, Умаров БР, Зияев ЯС. Общая характеристика пробиотиков. Новые перспективы создания пробиотиков в современной медицине. Фармация, иммунитет и вакцина. 2022;1:3-26.
2. Шарипова ЗО, Умаров БР, Зияев ЯС. Морфологическая, физиологическая и биотехнологическая характеристика бифидобактерий. Медицина и инновации. 2022;3(7):120-143.
3. Каннер ЕВ, Заплатников АЛ, Каннер ИД, Фарбер ИМ. Пробиотики и противомикробная резистентность: современные представления и новые терапевтические возможности. РМЖ. Мать и дитя. 2023;6(2):184-191. DOI: 10.32364/2618-8430-2023-6-2-184-191
4. Живодерова АИ, Самойленко ВС. Оценка *in vitro* пробиотических свойств и бактериоциногенного потенциала штаммов микроорганизмов *L. acidophilus* 13, *E. faecium* K-50 и их композиции. Международный вестник ветеринарии. 2023;4:78-86.
5. Хакбердиева ГЭ, Касимова ШШ. Эффективность применения лактобактерина при дисбактериозе у детей. Актуальные проблемы современной фармакотерапии. 2023;1(1):58-62.

References

1. Sharipova ZO, Umarov BR, Ziyayev YaS. General characteristics of probiotics, new prospects for the creation of probiotics in modern medicine. Journal of Pharmacy, Immunity and Vaccine. 2022;1:3-26. (In Russian).

2. Sharipova ZO, Umarov BR, Ziyayev YaS. Morphological, physiological and biotechnological characteristics of bifidobacterial. Journal of Medicine and Innovation. 2022;3(7):120-143. (In Russian).
3. Kanner EV, Zaplatnikov AL, Kanner ID, Farber IM. Probiotics and anti-infective resistance: modern concepts and new therapeutic possibilities. Russian Journal of Woman and Child Health. 2023;6(2):184-191. DOI: 10.32364/2618-8430-2023-6-2-184-191 (In Russian).
4. Zhivoderova AI, Samoylenko VS. *In vitro* evaluation of probiotic properties and bacteriocinogenic potential of strains of microorganisms *L. acidophilus* 13, *E. faecium* K-50 and their compositions. International Journal of Veterinary Medicine. 2023;4:78-86. (In Russian).
5. Khakberdieva GE, Kasimova ShSh. Efficiency of using lactobacterin in dysbacteriosis in children. Actual problems of modern pharmacotherapy. 2023;1 (1):58-62. (In Russian).

Информация о соавторах:

Абдильмянова Лилия Ильясовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии физиологически активных соединений Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан

Ёдгорова Нодира Тургунбаевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Ташкентской медицинской академии Республики Узбекистан

Information about co-authors:

Lilia I. Abdulmyanova, PhD, DSc (Biological Sciences), Leading Researcher, Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Nodira T. Yodgorova, PhD, MD, Associate Professor of the Department of microbiology, virology and immunology, Tashkent Medical Academy of the Republic of Uzbekistan

НОВОСТИ НАУКИ

Пищевые бактерии могут выживать в условиях приготовления пищи

Ученые из Института Квадрама и Агентства по безопасности здравоохранения Великобритании обнаружили, что популяции бактерий остаются стабильными на производственных площадках, несмотря на усилия по очистке на предприятиях по производству готовых к употреблению продуктов питания.

Listeria monocytogenes – это пищевая бактерия, вызывающая заболевание, называемое листериозом.

Безопасность продуктов питания имеет первостепенное значение в пищевой промышленности. Однако даже при наличии хорошо реализованных стратегий дезинфекции помещений и контроля микробных рисков такие микробы, как листерия, могут иногда нарушать барьеры безопасности пищевых продуктов и перекрестно загрязнять продукты питания. Это особенно опасно в готовых к употреблению продуктах, где потребители не будут убивать бактерии, вызывающие загрязнение, нагревая пищу перед употреблением.

Исследования показали, что популяции бактерий, которые сосуществуют с *L. monocytogenes*, были стабильны с течением времени и адаптировались к условиям на заводе, включая контроль безопасности пищевых продуктов. Поэтому, возможно, потребуется разработать новые стратегии для изменения всей популяции бактерий, чтобы эффективно устранить патоген.

Популяции очень стабильны, и очистка не меняет состав – она не позволяет одной бактерии разрастаться над другой. После очистки количество бактерий уменьшается, а бактериальная нагрузка снижается, что делает перекрестное загрязнение менее вероятным.

Была заметная разница между различными зонами производства при разных температурах; это говорит о том, что популяции бактерий в высокой степени адаптированы к различным средам. Это также предполагает наличие устоявшихся популяций.

Это новое исследование важно для понимания различных сообществ микробов в различных средах на предприятиях по производству готовой к употреблению пищи. Исследователи надеются, что понимание того, как листерия выживает в этих средах, может дать информацию для более точного лабораторного тестирования методов очистки.

«Scientists further our understanding of how a foodborne bacteria can survive in food preparation environments. Microbiology Society». Available at: <https://microbiologysociety.org/news/press-releases/scientists-further-our-understanding-of-how-a-foodborne-bacteria-can-survive-in-food-preparation-environments.html>

Генетическая обусловленность устойчивости к тяжелым металлам и ее связь с антибиотикорезистентностью у микроорганизмов, в том числе у бактерий рода *Vibrio*

А.В.Евтеев, С.О.Водопьянов

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

В обзоре приведены сведения о воздействии тяжелых металлов, присутствующих в окружающей среде, на микроорганизмы, включая представителей рода *Vibrio*. Гены устойчивости к тяжелым металлам широко представлены в природе и входят в состав плазмид мобильных генетических элементов и профагов, способных к горизонтальному переносу, что создает возможность при благоприятных условиях к приобретению микроорганизмами резистентности к тяжелым металлам. Показано, что устойчивость к тяжелым металлам может быть результатом как хромосомных мутаций, так и приобретения различных генетических элементов. Обобщены данные о связи между резистентностью к тяжелым металлам и устойчивостью к антибиотикам, что, возможно, объясняет существование общих механизмов (корезистентность и перекрестная устойчивость). Чаще всего данное явление описывается локализацией генов устойчивости к тяжелым металлам и антибиотикам на одних и тех же мобильных генетических элементах. Описаны данные по влиянию тяжелых металлов на процесс формирования биопленок и их роли в повышении резистентности к тяжелым металлам. В последнее десятилетие появились первые сведения о приобретении микроорганизмами рода *Vibrio* резистентности к различным металлам, однако этот процесс в отношении возбудителя холеры остается недостаточно изученным.

Ключевые слова: *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, тяжелые металлы, резистентность, плазмиды, мобильные генетические элементы, антибиотики, биопленки

Для цитирования: Евтеев А.В., Водопьянов С.О. Генетическая обусловленность устойчивости к тяжелым металлам и ее связь с антибиотикорезистентностью у микроорганизмов, в том числе у бактерий рода *Vibrio*. Бактериология. 2024; 9(3): 97–104. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-97-104

Genetic conditionality of heavy metals resistance and its relation to antibiotic resistance in microorganisms, including bacteria of the genus *Vibrio*

A.V.Evtsev, S.O.Vodopyanov

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

The review provides information on the effects of heavy metals present in the environment on microorganisms, including representatives of the genus *Vibrio*. Heavy metals resistance genes are widely represented in nature and are part of plasmids of mobile genetic elements and prophages capable of horizontal transfer, which makes it possible, under favorable conditions, for microorganisms to acquire resistance to heavy metals. It has been shown, that resistance to heavy metals can be the result of both chromosomal mutations and the acquisition of various genetic elements. The data on the relationship between heavy metals resistance and antibiotic resistance have been summarized, which may explain the existence of common mechanisms (coresistance and cross-resistance). Most often, this phenomenon is described by localization of heavy metals and antibiotic resistance genes on the same mobile genetic elements. Data on the effect of heavy metals on the formation of biofilms and their role in increasing resistance to heavy metals are described. In the last decade, the first information appeared about the acquisition of resistance to various metals by microorganisms of the genus *Vibrio*, but this process remains insufficiently studied in relation to the causative agent of cholera.

Key words: *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, heavy metals, resistance, plasmids, mobile genetic elements, antibiotics, biofilms

For citation: Evtsev A.V., Vodopyanov S.O. Genetic conditionality of heavy metals resistance and its relation to antibiotic resistance in microorganisms, including bacteria of the genus *Vibrio*. Bacteriology. 2024; 9(3): 97–104. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-97-104

Для корреспонденции:

Евтеев Артём Владимирович, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9133

Статья поступила 10.01.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Artem V. Evtsev, Junior 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) 240-9133

The article was received 10.01.2024, accepted for publication 30.09.2024

Тяжелые металлы (ТМ) – это группа химических элементов, которые присутствуют в окружающей среде (почва, вода, воздух) и могут оказывать негативное воздействие на человека и другие живые организмы. В последние годы этот термин получил значительное распространение, причем в различных научных и прикладных работах авторы по-разному трактуют его значение [1], учитывая не только химические и физические свойства элементов, но и их биологическую активность и токсичность. Несмотря на то, что некоторые ТМ в допустимых концентрациях играют важную роль для живых организмов, участвуя в различных клеточных процессах, включая производство энергии, репликацию и транскрипцию [2], неконтролируемое загрязнение окружающей среды ТМ может иметь серьезные последствия для здоровья человека.

Контаминация почвы ТМ может представлять риски как для человека, так и для экосистемы посредством прямого попадания, контакта с загрязненной почвой или через пищевую цепочку (почва-растение-человек или почва-растение-животное-человек). При этом чаще всего из числа ТМ обнаруживают хром (Cr), цинк (Zn), кадмий (Cd), медь (Cu), ртуть (Hg), никель (Ni) и свинец (Pb) [3]. Токсичность ТМ зависит от ряда факторов: концентрации, химических свойств и т.д. [4].

По данным Всемирной организации здравоохранения, мышьяк (As), Cd, Pb и Hg входят в число наиболее опасных химических веществ, представляющих глобальную угрозу здоровью населения. Индустриализация и урбанизация увеличили вероятность реализации негативного воздействия на человека ТМ, которые также способны длительно сохраняться в экосистемах [5]. В Бангладеш отмечаются высокие концентрации ТМ в водных объектах, в т.ч. на территориях, где традиционно на протяжении десятилетий регистрируется циркуляция патогенных вибрионов, что вызывает настороженность у специалистов [6].

Характерными загрязнителями воды водоемов территорий Российской Федерации являются фенолы (до 2,3 предельно допустимой концентрации (ПДК)), железо (до 3,4 ПДК), марганец (до 25,9 ПДК), нефтепродукты (до 11,2 ПДК), медь (до 11,0 ПДК), железо (до 10,2 ПДК), цинк (до 1,9 ПДК), никель (до 2,3 ПДК) [7].

На территории Южного федерального округа р. Дон является одной из важнейших водных артерий юга страны и характеризуется загрязнением продуктами промышленной деятельности человека [8]. В составе донных отложений р. Темерник (приток Дона) идентифицированы вещества I и II класса химической опасности (ТМ) [9]. При анализе среднегодового содержания нефтепродуктов в реках Дон и Темерник установлено максимальное превышение ПДК в р. Темерник (например, в 2017 г. в 104,8 раза), что не препятствовало выделению нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 (эпизодически токсигенных) и штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп из проб воды в ходе мониторинговых исследований на вибриофлору указанных поверхностных водоемов практически ежегодно [10]. Напротив, наибольший процент этих выделенных штаммов был зарегистрирован в водоемах, где обнаружено значительное превышение ПДК по содержанию нефтепродуктов (в 220 раз) [8]. Нефтяное загрязнение, как правило, дополнительно сопровождается присутствием ТМ. Более 40% земель, загрязненных нефтью, содержит высокие концентрации таких ТМ, как

As, Cd, Cr, Hg, Mo (молибден), Ni, Pb, V (ванадий), Zn [11, 12]. Данные поллютанты попадают в открытые экосистемы в результате производственной деятельности человека. В отличие от органических загрязнителей, они не подвергаются процессам разложения, а лишь перераспределяются между отдельными компонентами природной среды [13, 14]. Мы предполагаем, что холерные вибрионы, обладающие высокой пластичностью генома и адаптационной изменчивостью [15, 16], уже приобрели устойчивость к новому значимому экологическому фактору – нефтепродуктам.

Вместе с тем остается недостаточно изученным влияние, оказываемое ТМ на микроорганизмы. В этой связи, учитывая условия длительного их контакта с ТМ в водных экосистемах, представляет интерес изучение возможного влияния данных веществ на биологические свойства бактерий, в т.ч. на представителей рода *Vibrio*.

Целью настоящего обзора является анализ литературных данных о генетической детерминации устойчивости к ТМ и антибиотикорезистентности у различных микроорганизмов, в т.ч. у бактерий рода *Vibrio*.

Генетические факторы устойчивости микроорганизмов к ТМ

Антибактериальные биоциды и ТМ могут способствовать развитию и поддержанию устойчивости к антибиотикам в бактериальных сообществах. Однако информация о генах, детерминирующих эту устойчивость, включая последовательности генов и их молекулярные функции, разрознена. P.Chandan et al. (2014) на основании результатов секвенирования обобщили и представили информацию о генах устойчивости к металлам и антибактериальным биоцидам в виде базы данных BacMet (<http://bacmet.biomedicine.gu.se>), содержащей сведения о 470 экспериментально подтвержденных генах устойчивости, а также о 25 477 генах потенциальной устойчивости [17].

C.Xu et al. (2018) описали мутантный штамм *Synechocystis* ALE-9.0, который приобрел повышенную устойчивость к Cd (с 4,6 до 9,0 мкМ) посредством 128 непрерывных пассажей в течение 802 дней на питательной среде, содержащей этот металл в разных концентрациях. При этом у данного штамма была установлена перекрестная толерантность к цинку и кобальту, а также более высокая, по сравнению с исходным штаммом, устойчивость к ультрафиолетовому излучению [18].

Путем транспозонного мутагенеза получен штамм *Saccharomyces cerevisiae*, устойчивый к 50 мкМ Pb и 30 мкМ Cd. Мутант рос быстрее дикого (исходного) штамма и показал сниженное, по сравнению с ним, содержание внутриклеточной концентрации активных форм кислорода при воздействии Pb и Cd. Мутация была локализована в гене *RIM15*. Данный ген известен как один из регуляторных IME2 (индуктор мейоза 2) и представляет собой протеинкиназу, которая относится к семейству PAS. Авторы заключили, что мутация *RIM15* приводит к повышению устойчивости к ТМ за счет активации *MSN4* и *STRE*-опосредованных генов [19].

В ряде случаев гены резистентности к воздействию ТМ локализованы на плаزمидах. У *Staphylococcus aureus* они содержат гены, обеспечивающие устойчивость к неорганической ртути [20].

Плазмиды играют ключевую роль в формировании адаптивности *Acinetobacter* к условиям внешней среды и отличаются по своей структуре в зависимости от образа жизни бактерий-хозяев. В настоящее время бактериальные ассоциации имеют в составе своих геномов плазмиды, которые, в свою очередь, содержат гены устойчивости к широкому спектру современных антибиотиков. Вместе с тем гены устойчивости к ТМ могут находиться в плаزمиде как современных, так и «древних» бактериальных штаммов [21].

Имеются сведения о присутствии плазмид в различных штаммах *Salmonella abortus*, детерминирующих резистентность как к ампициллину, так и к ТМ – As, Cd, Hg и Cr, при элиминации которых бактерии становились чувствительными к противомикробным препаратам [22, 23], а также отмечалась корреляция между устойчивостью к токсическому действию меди и резистентностью к макролидам и гликопептидам. В серии экспериментов удалось перенести плазмиды изолированных от свиней *Enterococcus faecium*, содержащие гены *tcrB* и *ermB*, ответственные за устойчивость к меди и макролидам, восприимчивому реципиенту [22, 24]. Плаزمиды типа IncA/C, содержащая детерминанту устойчивости к ртути (*mer*-оперон) и несколько генов устойчивости к антибиотикам, была выделена из *Aeromonas salmonicida*, изолированных из объектов аквакультуры [22, 25].

Изучение данных секвенирования подтвердило, что генетические элементы в результате множественных процессов рекомбинации приобрели транспозоны, которые могут содержать гены устойчивости к антибиотикам и металлам [22, 26]. Генетический анализ *Salmonella* TyphI выявил сосуществование множества генов устойчивости к антибиотикам и Hg в составе конъюгативной плазмиды pNCM1 [27]. Многие транспозоны, кодирующие устойчивость к антибиотикам у грамотрицательных представителей *Enterobacteriaceae*, принадлежат к подгруппе Tn21 семейства мобильных элементов Tn3. Tn 21 несет оперон устойчивости к ртути (*mer*). Поэтому эффективный механизм горизонтальной передачи генов способствовал широкому распространению устойчивости к антибиотикам и металлам, например, посредством Tn21 и Tn21-подобных транспозонов, содержащих гены устойчивости к Hg и As (мышьяк) [30]. Конъюгативная плаزمиды *E. faecium* содержит транспозон Tnmer1, несущий детерминанты устойчивости к ртути, и ген устойчивости к стрептомицину (*aadK*) [22, 28, 29].

Плазмиды G4 pNC143 обнаружена в пяти изолятах *Listeria monocytogenes*. В ее составе выявлены опероны устойчивости к ртути (*mer*), оперон, предположительно придающий устойчивость к соединениям четвертичного аммония (*qacC*), и транспозон семейства Tn554 с опероном устойчивости к мышьяку (*arsABCD*) [30].

Зарубежными исследователями показано, что устойчивость к серебру, обладающему микробиоцидным действием в низких концентрациях и используемому для лечения ожогов, ран и покрытия катетеров, чтобы замедлить развитие микробной биопленки, обеспечивается плазмидой *Salmonella* pMGH100, обусловленной активностью девяти генов [31].

У холерного вибриона показано наличие систем защиты от чужеродной генетической информации в виде гетерологичных плазмид – оперонов *DdmABC* и *DdmDE*, гены кото-

рых локализованы на двух основных островах патогенности – VPI-2 и VSP-II. Функция *DdmDE* заключается в деградации сравнительно небольших мультикопийных плазмид, а система *DdmABC* элиминирует крупные конъюгативные плазмиды [32]. Поэтому участие конъюгативных плазмид в перспективе обеспечения резистентности холерного вибриона к ТМ представляется маловероятным.

ICE (Integrative Conjugative Elements) представляют собой мобильные генетические элементы, которые опосредуют горизонтальный перенос генов между бактериями [33]. Показано, что они способны кодировать широкий спектр генетической информации, наделяя своих хозяев различными признаками, в т.ч. и устойчивостью к антибиотикам и ТМ [33].

Показано, что добавление меди в почву сельскохозяйственного назначения повышает устойчивость к антибиотикам наряду с устойчивостью к меди путем стимулирования горизонтального переноса генов ICE [34]. Гены резистентности к ТМ были идентифицированы в составе ICE *E. faecalis*, *Bacteroides*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus rettgeri* и *Clostridium* spp. [35].

Полногеномное секвенирование и последующий анализ 250 изолятов *L. monocytogenes*, изолированных при изучении молочных ферм, выявил множество мобильных генетических элементов, несущих гены устойчивости к противомикробным препаратам, биоцидам и ТМ [30]. Так, интегративный элемент Tn7101, обнаруженный в изоляте ST155 HC258, содержал гены устойчивости к кадмию (*cadA* и *cadC*) и арсенатредуктазу (*arsC*), а с помощью BLAST идентифицирован вариант Tn7101, содержащий каскад устойчивости к мышьяку из семи генов [30].

Способность *V. cholerae* приобретать ICE-элементы [36, 37] свидетельствует о возможности приобретения устойчивости к ТМ посредством этого механизма, особенно при циркуляции вибрионов в загрязненных ТМ водоемах.

Найденный у *L. monocytogenes* профаг представляет собой геном фага, интегрированный в хромосомную ДНК бактериальных клеток. В случае фаговой индукции происходит синтез частиц фага, иногда захватывающих фрагменты хромосомы хозяина. Хорошо изучен перенос профагом оперона токсинообразования у холерного вибриона. Описаны единичные случаи содержания генов устойчивости к ТМ в составе профагов. Так, изоляты *L. monocytogenes*, идентифицированные на молочных фермах, характеризовались разнообразием мобильных элементов, включая три новые плазмиды, три новых транспозона и новый профаг, несущий гены устойчивости к Cd. В геномах листерий, хранящихся в GenBank, идентифицированы профаги, которые несут гены устойчивости к кадмию (*cadA*), макролидам (*mefA*, *msrD*), тетрациклину (*tetM*) и стрептограмину (*vatA*), встроенные между *rlmCD* и *fosX* [30].

Влияние ТМ на приобретение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам

Исследователями подтверждена связь между загрязнением окружающей среды ТМ и устойчивостью к антибиотикам, что позволяет предположить, существование общих механизмов, к которым относят корезистентность (разные детерминанты устойчивости присутствуют в одном и том же

генетическом элементе) и перекрестную устойчивость (одна и та же генетическая детерминанта ответственна за устойчивость к антибиотикам и ТМ) [38].

В случае локализации генов устойчивости к ТМ и антибиотикам на одном ICE [39] реципиент в результате генетического переноса при воздействии одного селективного фактора приобретает устойчивость и к другому [22, 40]. Кроме того, повышение экспрессии генов устойчивости к антибиотикам может быть результатом прямого воздействия ТМ. На модели штамма LSJC7, который является грамотрицательным представителем семейства *Enterobacteriaceae* порядка *Enterobacteriales* класса *Gammaproteobacteria*, показано, что воздействие мышьяка повышает экспрессию гена множественной лекарственной устойчивости к антибиотикам *emrD* и гена устойчивости к тетрациклину *tet34* [20, 39]. Кроме того, экспрессия *soxS*, универсального белка-регулятора, управляющего насосом множественного оттока лекарств *acrAB* у *Escherichia coli* и *Salmonella* spp., повышается в ответ на воздействие окислительного стресса, вызванного ТМ, такими как Cd, Cu и Cr [22, 41]. Cd и Cu также могут подавлять регуляторный оперон множественной устойчивости к антибиотикам *marRAB* как у *Salmonella* spp., так и у *E. coli* [42, 43].

Значение устойчивости к ТМ у различных микроорганизмов в процессе формирования биопленок

Биопленки представляют собой микробные сообщества, состоящие из микроорганизмов и внеклеточного матрикса, и являются одним из способов выживания микроорганизмов при воздействии неблагоприятных условий. Влияние ТМ можно рассматривать как частный случай экстремальных факторов, в т.ч. они активируют выработку планктонными клетками компонентов, способствующих клеточной адгезии и образованию биопленок [38].

Проведены исследования индукции образования биопленки за счет выработки внеклеточных полимеров при воздействии ТМ на *Phormidium* и *Pseudomonas* [44]. Показано присутствие микроорганизмов в виде биопленок в загрязненном металлами иле [45], а с помощью сканирующей электронной микроскопии содержимого биореакторов, предназначенных для очистки промышленных стоков, содержащих ртуть, – наличие биопленок, состоящих из монослоя ртутьвосстанавливающих бактерий [46].

Исследование влияния серебра в наночастицах на жизнеспособность, биопленкообразование и экспрессию генов оперона *icaADBC* и гена *icaR* у штаммов *Staphylococcus epidermidis* показало, что жизнеспособность всех испытуемых штаммов снижалась при его концентрации 5 мкг/мл, а способность к образованию биопленки – при 3 мкг/мл. Экспрессия генов оперона *icaADBC* и *icaR* варьировала в зависимости от способности штамма образовывать биопленку. Низкие концентрации наночастиц серебра вызвали повышенное образование биопленки, однако при высоких концентрациях такого эффекта не наблюдалось. Полученные авторами данные подтверждают антибактериальные свойства частиц наносеребра [47].

Исследование по изучению воздействия Cu, Pb и Zn на биопленку и планктонную форму *P. aeruginosa* продемонстрировало, что клетки в составе биопленки в 2–600 раз более

устойчивы к воздействию ТМ по сравнению с планктонной формой. Внешняя часть биопленки погибала после воздействия повышенных концентраций меди, а большинство живых клеток находилось вблизи субстрата, что можно объяснить способностью внеклеточных полимеров биопленки связывать ТМ и замедлять их диффузию внутри биопленки [48].

Сравнительный анализ биопленочных и планктонных культур *E. coli* JM109, *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 продемонстрировал, что культуры в составе биопленок в 2–64 раза устойчивее, чем планктонная форма, а сочетанное воздействие нескольких металлов приводило к гибели планктонных и биопленочных культур большинства изученных комбинаций [49].

Для оценки воздействия Cd на образование биопленок *S. epidermidis* (ATCC 35984) бактерии культивировали в присутствии различных концентраций (0–50 мкМ) Cd. Концентрации Cd 1,56 и 3,13 мкМ стимулировали образование биопленок *S. epidermidis*, но ингибировали этот процесс при повышении до 6,25 мкМ. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия продемонстрировала увеличение толщины биопленки после воздействия 1,56 или 3,13 мкМ Cd соответственно до 23 и 22 мкм по сравнению с 17,8 мкм в контроле. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени показала повышение активности генов *atfE*, *embp*, *aap*, *icaA* и *icaB* после воздействия 3,13 мкМ Cd. Эти результаты показывают, что Cd в низких субтоксичных концентрациях, не влияющих на жизнеспособность бактерий, действует как индуктор образования биопленки *S. epidermidis* [50].

На территориях, загрязненных ТМ, выделено 15 штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, у которых была изучена резистентность к воздействию ТМ (Cd, Cr, Pb и Ni). Способность изолированного штамма *Enterobacter cloacae* MC9 образовывать биопленки существенно снижалась при концентрации Cd, Cr, Pb и Ni в 200 мкг/мл на 73, 64, 51 и 42% соответственно по сравнению с контролем [51].

Изучение антимикробной активности нанокомпозитов Ag, Cu и Zn проводили и на холерных вибрионах: на границе фаз жидкость/воздух (пелликулярная биопленка) и жидкость / твердая поверхность (поверхностно-прикрепленная). Показано, что только нанокомпозит, содержащий Ag, был более чем в 2 раза токсичен для планктонных клеток *V. cholerae*, чем для клеток, прикрепленных к твердой фазе [52].

При воздействии наночастиц Ag и Zn на холерный вибрион и энтеротоксигенную кишечную палочку показано, что наночастицы Zn обладали более высокой эффективностью, а сублетальные концентрации изученных компонентов приводили к усилению образования биопленок *V. cholerae* [53].

Эффективность наночастиц оксида цинка в отношении холерного вибриона была исследована на модели представителей двух биотипов: классического и El Tor. Установлено, что штамм *V. cholerae* El Tor более чувствителен, как в планктонной, так и в биопленочной форме [54].

Таким образом, воздействие ТМ является сложным и многофакторным процессом, который в ряде случаев способен индуцировать формирование биопленки, помогает бактериям выживать в неблагоприятных условиях [55], что определяет перспективность дальнейших исследований в этом направлении.

Влияние ТМ на представителей рода *Vibrio*

На сегодняшний день толерантность к ТМ у микроорганизмов рода *Vibrio* изучена мало. Однако активное использование аквакультуры, а также воды содержащей промышленные загрязнители (например, ТМ), способствовало появлению интереса у исследователей к изучению *Vibrio parahaemolyticus* как агента, наносящего экономический ущерб.

Исследование на семи штаммах *V. parahaemolyticus*, устойчивых к Со и Си, продемонстрировало, что предварительная обработка вибрионов этими металлами вела к повышенной устойчивости к канамицину, стрептомицину, тетрациклину и гентамицину, и наоборот – предварительная обработка противомикробными препаратами повышала толерантность к ТМ [56].

Так, среди 112 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из тихоокеанской скумбрии, была выявлена устойчивость к восьми ТМ – Cd, Pb, Cu, Zn, Co, Ni, Mn и Cr. В общей сложности 18,75% штаммов были чувствительны ко всем ТМ, в то время как 3,57% штаммов проявляли устойчивость ко всем ТМ, за исключением Cr [57].

В другом исследовании у 208 отобранных штаммов *V. parahaemolyticus*, изолированных из 10 видов ракообразных и моллюсков, устойчивость к ТМ варьировала в зависимости от источника их выделения. Штаммы, выделенные из *Litopenaeus vannamei* и *Busycon canaliculatus*, были устойчивы к восьми ТМ, тогда как изоляты, выделенные из *Procambarus clarkii* и *Tegillarca granosa*, были менее устойчивы. Культуры, выделенные из *Haliotis discus hannai*, *Marsupenaeus japonicus* и *L. vannamei*, были толерантны к Cu, Pb и Cd соответственно. Также наблюдалась толерантность к Cr и Hg. Кроме того, некоторые изоляты были устойчивы к Ni [58].

У штамма *V. parahaemolyticus* MDR N10-18, полученного из *Ostrea gigas Thunberg*, выявлена высокая толерантность к Cd и Zn. Рост был ингибирован в присутствии 50 мкг/мл Cd, при этом отмечено изменение проницаемости и гидрофобности поверхности клеток [59].

Изучение 59 штаммов *V. parahaemolyticus*, изолированных в 2016 г. в районах добычи моллюсков у западного побережья Кореи, показало, что большинство из них проявляли устойчивость к Ва (98,3%), Со (28,8%), Cd (16,9%) и Си (13,6%). Интересно, что толерантность к ТМ преобладала у штаммов *V. parahaemolyticus* с более чем двумя фенотипами устойчивости к антибиотикам [60].

В аналогичном исследовании 22 штаммов *V. anguillarum*, выделенных из кефали, выращенной на нескольких рыбных фермах Южной Кореи, установлено, что все изоляты были устойчивы к оксациллину, тикарциллину, стрептомицину и ципрофлоксацину (высокая частота встречаемости генов устойчивости *qnrS* (95,5%), *qnrB* (86,4%) и *StrAB* (27,3%)). При этом 40,9% изолятов были толерантны к Cd, что, по мнению авторов, могло быть связано с наличием у 86,4% штаммов гена устойчивости к ТМ *czcA* [61].

Изоляты *V. cholerae*, полученные из вод устья реки Янцзы в Шанхае, Китай, проявили высокий уровень толерантности к Hg, Cd, Cu, Pb [62].

Из 400 штаммов *V. cholerae*, выделенных из четырех видов пресноводных рыб, 198, 121 и 48 изолятов были устойчивы к Hg, Zn и Pb соответственно. В этом исследова-

нии 96 холерных вибрионов имели устойчивость к двум или более ТМ, а один изолят – к 4 из 8. Напротив, все изоляты были неустойчивы к Cu²⁺ и Mn. Полученные данные позволяют предположить, что изоляты *V. cholerae* от четырех видов рыб имели разный характер толерантности к ТМ [63].

При изучении толерантности к Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Mn и Zn у 370 штаммов *V. cholerae*, выделенных из 12 различных морепродуктов, в качестве контроля были использованы штаммы *E. coli* ATCC25922 и K12. Среди изолятов наблюдалась высокая частота толерантности к ТМ Hg (69,5%), Ni (32,4%) и Cd (30,8%). 17,4% культур были устойчивы к трем или четырем ТМ [64].

Присутствие токсичного арсената (As⁵⁺) в окружающей среде привело к формированию механизмов устойчивости. Детоксикация As⁵⁺ бактериями основана на восстановлении до арсенита As³⁺ с помощью продукта гена *arsC* с последующим экспортом As³⁺ при участии *rsB*. Однако этот процесс у патогенных микроорганизмов остается в значительной степени малоизученным. В 2022 г. проведено исследование с целью изучения толерантности энтеропатогенных бактерий к мышьяку. Поскольку для возбудителя холеры Бангладеш и Индия являются эндемичными регионами, где концентрации As⁵⁺ в воде и почве являются самыми высокими в мире [65], устойчивость *V. cholerae* к As⁵⁺ могла возникнуть в процессе адаптации возбудителя, которая позволила существовать в средах с высокой концентрацией данного металла [65]. Было установлено, что возбудитель холеры способен расти на средах с добавлением супрафизиологических (30 мМ) концентраций арсената As⁵⁺. При этом данный уровень устойчивости не был характерен для других кишечных патогенов человека, поскольку даже более низкая концентрация As⁵⁺ (10 мМ) приводила к частичному или полному ингибированию роста *S. enterica*, *Citrobacter rodentium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, энтерогеморрагической *E. coli* (ЕНЕС) и *Shigella flexneri*. Столь высокий уровень устойчивости вибрионов к мышьяку опосредован альтернативным путем метаболизма через активность арсеникум-индуцируемого оперона VC1068-1071, кодирующего арсенатный репрессор *ArsR*, альтернативную глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, предполагаемую фосфатазу и ген-переносчик. Проведенная оценка протеома у *V. cholerae* при воздействии As⁵⁺ показала активацию небольшого количества белков. Это доказывает, что адаптация к As⁵⁺ может не требовать глобальной перестройки генома. Данная работа является одной из первых, демонстрирующих факт эволюционного ответа *V. cholerae* на изменение экологических факторов [63].

Анализ данных литературы о влиянии различных ТМ на микроорганизмы рода *Vibrio* показал некоторое расхождение результатов определения резистентности к ТМ. Например, действующая концентрация Cd, наиболее изученного ТМ, варьирует у различных авторов от 400 до 50 мкг/мл. Возможно, подобные расхождения обусловлены отсутствием стандартизированной методики определения минимальной ингибирующей концентрации. Очевидно, необходимо создание контрольных охарактеризованных штаммов, выступающих в качестве стандартных образцов [63].

В ходе расшифровки механизма резистентности к токсическому воздействию Pb, Zn, Ni на модели трех штаммов холерного вибриона при сравнительном секретомном и про-

теомном анализе выявлены общие механизмы клеточной защиты, которые заключались в активации насосов оттока транспортеров RND и ABC, повышенной экспрессии глутатионпероксидазы, синтезе экзогенного полисахарида как внеклеточного биосорбента. Кроме того, выявлен ряд межштаммовых различий: у одних штаммов воздействие Pb индуцировало биосинтез гидрофобных аминокислот, у других Cd индуцировал накопления таурина, у третьих Zn стимулировал экспрессию белка и биосинтеза тиамина, а Ni запускал экспрессию T6SS-ассоциированных белков [66].

Заключение

Таким образом, ТМ, присутствующие во внешней среде, представляют экологически значимый фактор, способный вызывать существенное изменение различных свойств микроорганизмов. Имеющиеся в литературе сведения о связи резистентности к ТМ и устойчивости к антибиотикам, свидетельствуют не только об актуальности таких исследований, но и о новых возможностях в вопросе преодоления этой резистентности. Работы последнего десятилетия подтверждают распространение фенотипа устойчивости к ТМ и у микроорганизмов рода *Vibrio*. Однако полученных данных недостаточно для оценки возможного влияния данного процесса на бактерии рода *Vibrio*, в т.ч. и холерный вибрион. Расшифровка молекулярных механизмов, которые лежат в основе возникновения устойчивости у холерного вибриона к ТМ и сопутствующего появления множественной лекарственной устойчивости, остается в центре внимания специалистов и требует проведения дальнейших экспериментальных исследований.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financing

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Теплая ГА. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы). Астраханский вестник экологического образования. 2013;1(23):182-192. / Teplaya GA. Heavy metals as a factor of environmental pollution (literature review). Astrakhan Bulletin of Environmental Education. 2013;1(23):182-192. (In Russian).
2. Becker KW, Skaar EP. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. FEMS Microbiol Rev. 2014 Nov;38(6):1235-49. DOI: 10.1111/1574-6976.12087
3. Wuana RA, Okieimen FE. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. International Scholarly Research Notices, 2011.
4. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. Exp Suppl. 2012;101:133-64. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6
5. Chen R, Tu H, Chen T. Potential Application of Living Microorganisms in the Detoxification of Heavy Metals. Foods. 2022 Jun 27;11(13):1905. DOI: 10.3390/foods11131905
6. Sandhi A, Yu C, Rahman MM, Amin MN. Arsenic in the water and agricultural crop production system: Bangladesh perspectives. Environ Sci Pollut Res Int. 2022 Jul;29(34):51354-51366. DOI: 10.1007/s11356-022-20880-0
7. Государственный доклад о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. / State report on the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2022: State report. M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 2023. (In Russian).
8. Левченко ДА, Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Титова СВ, Кругликов ВД, Архангельская ИВ, и др. Влияние гидрохимических показателей воды рек Дон и Темерник на обнаружение холерных вибрионов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2019;15(3):25-31. / Levchenko, DA, Menshikova EA, Kurbatova EM, Titova SV, Kruglikov VD, Arkhangel'skaya IV, et al. The influence of hydrochemical parameters of the water of the Don and Temernik rivers on the detection of cholera vibriions. Bulletin of Biotechnology and Physico-Chemical Biology n.a. Y.U.Ovchinnikov. 2019;15(3):25-31. (In Russian).
9. Кленова ИА, Шульга ТГ. Технология очистки реки Темерник. Инженерный вестник Дона. 2018;1(48):118. / Klenova IA, Shulga TG. The technology of cleaning the Temernik River. Engineering Bulletin of the Don. 2018;1(48):118. (In Russian).
10. Москвитина ЭА, Тюленева ЕГ, Кругликов ВД, Титова СВ, Водопьянов АС, Куриленко МЛ, и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2018;1:36-43. / Moskvitina EA, Tyuleneva EG, Kruglikov VD, Titova SV, Vodopyanov AS, Kurylenko ML, et al. Cholera: assessment of the epidemiological situation in the world and Russia in 2008–2017. Forecast for 2018. Problems of Especially Dangerous Infections. 2018;1:36-43. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-36-43 (In Russian).
11. Kovalick W. Perspectives on risks of soil pollution and experience with innovative remediation technologies. Strategies 2000. Proc. W. Congr. Chem. Eng. 4th; 1991;282.
12. Gondal MA, Hussain T, Yamani ZH, Baig MA. Detection of heavy metals in Arabian crude oil residue using laser induced breakdown spectroscopy. Talanta. 2006 Jul 15;69(5):1072-8. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.11.023
13. Semple KT, Morriss AWJ, Paton GI. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. European Journal of Soil Science. 2003;54(4):809-818.
14. Landrigan PJ, Raps H, Cropper M, Bald C, Brunner M, Canonizado EM, et al. The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health. Ann Glob Health. 2023 Mar 21;89(1):23. DOI: 10.5334/aogh.4056
15. Escudero JA, Mazel D. Genomic Plasticity of *Vibrio cholerae*. Int Microbiol. 2017 Sep; 20(3):138-148. DOI: 10.2436/20.1501.01.295
16. Cava F. Biology of *Vibrio cholera*. Editorial overview. Int Microbiol. 2017 Sep; 20(3):105. DOI: 10.2436/20.1501.01.290
17. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. Nucleic Acids Res. 2014 Jan; 42(Database issue):D737-43. DOI: 10.1093/nar/gkt1252
18. Xu C, Sun T, Li S, Chen L, Zhang W. Adaptive laboratory evolution of cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biotechnol Biofuels. 2018 Jul 24;11:205. DOI: 10.1186/s13068-018-1205-x
19. Kim HS. Disruption of RIM15 confers an increased tolerance to heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett. 2020 Jul;42(7):1193-1202. DOI: 10.1007/s10529-020-02884-3

20. Weiss AA, Murphy SD, Silver S. Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1977 Oct;132(1):197-208. DOI: 10.1128/jb.132.1.197-208.1977
21. Maslova O, Mindlin S, Beletsky A, Mardanov A, Petrova M. Plasmids as Key Players in *Acinetobacter* Adaptation. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 17;23(18):10893. DOI: 10.3390/ijms231810893
22. Vats P, Kaur UJ, Rishi P. Heavy metal-induced selection and proliferation of antibiotic resistance: A review. *J Appl Microbiol.* 2022 Jun;132(6):4058-4076. DOI: 10.1111/jam.15492
23. Ghosh A, Singh A, Ramteke PW, Singh VP. Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 27;272(1):6-11. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2727
24. Hasman H, Aarestrup FM. *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 May;46(5):1410-6. DOI: 10.1128/AAC.46.5.1410-1416.2002
25. McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, et al. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jun;61(6):1221-8. DOI: 10.1093/jac/dkn123
26. Dennis JJ. The evolution of IncP catabolic plasmids. *Curr Opin Biotechnol.* 2005 Jun;16(3):291-8. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.04.002
27. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature.* 2001 Oct 25;413(6858):848-52. DOI: 10.1038/35101607
28. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Sep;63(3):507-22. DOI: 10.1128/MMBR.63.3.507-522.1999
29. Davis IJ, Roberts AP, Ready D, Richards H, Wilson M, Mullany P. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid.* 2005 Jul;54(1):26-38. DOI: 10.1016/j.plasmid.2004.10.004
30. Castro H, Douillard FP, Korkeala H, Lindström M. Mobile Elements Harboring Heavy Metal and Bacitracin Resistance Genes Are Common among *Listeria monocytogenes* Strains Persisting on Dairy Farms. *mSphere.* 2021 Aug 25;6(4):e0038321. DOI: 10.1128/mSphere.00383-21
31. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 2003 Jun;27(2-3):341-53. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00047-0
32. Jaskólska M, Adams DW, Blokesch M. Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2022 Apr;604(7905):323-329. DOI: 10.1038/s41586-022-04546-y
33. Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Aug;8(8):552-63. DOI: 10.1038/nrmicro2382
34. Berg J, Thorsen MK, Holm PE, Jensen J, Nybroe O, Brandt KK. Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. *Environ Sci Technol.* 2010 Nov 15;44(22):8724-8. DOI: 10.1021/es101798r
35. Johnson CM, Grossman AD. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet.* 2015;49:577-601. DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-055018
36. Waldor MK, Tschäpe H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol.* 1996 Jul;178(14):4157-65. DOI: 10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996
37. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011 Aug 24;477(7365):462-5. DOI: 10.1038/nature10392
38. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006 Apr;14(4):176-82. DOI: 10.1016/j.tim.2006.02.006
39. Chen S, Li X, Sun G, Zhang Y, Su J, Ye J. Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in Bacterium LSJC7. *Int J Mol Sci.* 2015 Sep 29;16(10):23390-404. DOI: 10.3390/ijms161023390
40. Gómez-Sanz E, Kadlec K, Feßler AT, Zarazaga M, Torres C, Schwarz S. Novel erm(T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):3275-82. DOI: 10.1128/AAC.00171-13
41. Kaur UJ, Chopra A, Preet S, Raj K, Kondepudi KK, Gupta V, et al. Potential of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, an efflux pump inhibitor against cadmium-induced multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi as an adjunct to antibiotics. *Braz J Microbiol.* 2021 Sep;52(3):1303-1313. DOI: 10.1007/s42770-021-00492-5
42. Hao Z, Lou H, Zhu R, Zhu J, Zhang D, Zhao BS, et al. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol.* 2014 Jan;10(1):21-8. DOI: 10.1038/nchembio.1380
43. Eaves DJ, Ricci V, Piddock LJ. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Apr;48(4):1145-50. DOI: 10.1128/AAC.48.4.1145-1150.2004
44. García-Meza JV, Barrangue C, Admiraal W. Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environ Toxicol Chem.* 2005 Mar;24(3):573-81. DOI: 10.1897/04-064r.1
45. Wuertz S, Okabe S, Hausner M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Sci Technol.* 2004;49(11-12):327-36.
46. Wagner-Döbler I, Lünsdorf H, Lübbelhusen T, von Canstein HF, Li Y. Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4559-63. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4559-4563.2000
47. Swolana D, Wojtyczka RD. Activity of Silver Nanoparticles against *Staphylococcus* spp. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 13;23(8):4298. DOI: 10.3390/ijms23084298
48. Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Apr;69(4):2313-20. DOI: 10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003
49. Harrison JJ, Ceri H, Stremick CA, Turner RJ. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ Microbiol.* 2004 Dec;6(12):1220-7. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00656.x
50. Wu X, Santos RR, Fink-Gremmels J. Cadmium modulates biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Environ Res Public Health.* 2015 Mar 4;12(3):2878-94. DOI: 10.3390/ijerph120302878
51. Syed A, Zeyad MT, Shahid M, Elgorban AM, Alkhulaifi MM, Ansari IA. Heavy Metals Induced Modulations in Growth, Physiology, Cellular Viability, and Biofilm Formation of an Identified Bacterial Isolate. *ACS Omega.* 2021 Sep 16;6(38):25076-25088. DOI: 10.1021/acsomega.1c04396
52. Meza-Villezas A, Gallego-Hernández AL, Yildiz FH, Jaime-Acuña OE, Raymond-Herrera O, Huerta-Saquero A. Effect of antimicrobial nanocomposites on *Vibrio cholerae* lifestyles: Pellicle biofilm, planktonic and surface-attached biofilm. *PLoS One.* 2019 Jun 12;14(6):e0217869. DOI: 10.1371/journal.pone.0217869
53. Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratter G, Prassl R, Goessler W, et al. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2015 Jan;305(1):85-95. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005
54. Sarwar S, Chakraborti S, Bera S, Sheikh IA, Hoque KM, Chakraborti P. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype. *Nanomedicine.* 2016 Aug;12(6):1499-509. DOI: 10.1016/j.nano.2016.02.006
55. Zheng D, Yin G, Liu M, Chen C, Jiang Y, Hou L, et al. A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Sci Total Environ.* 2021 Jul 10;777:146009. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146009

56. Jo S, Shin C, Shin Y, Kim PH, Park JI, Kim M, et al. Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish. *Mar Pollut Bull.* 2020 Jul;156:111246. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020
57. Fang J, Cheng H, Yu T, Jiang H. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic and Heavy Metal Resistance in *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Pacific Mackerel at Markets in Zhejiang, China. *J Food Prot.* 2020 Aug 1;83(8):1411-1419. DOI: 10.4315/JFP-20-091
58. Hu Q, Chen L. Virulence and Antibiotic and Heavy Metal Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Crustaceans and Shellfish in Shanghai, China. *J Food Prot.* 2016 Aug;79(8):1371-7. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-031
59. Yu P, Yang L, Wang J, Su C, Qin S, Zeng C, et al. Genomic and Transcriptomic Analysis Reveal Multiple Strategies for the Cadmium Tolerance in *Vibrio parahaemolyticus* N10-18 Isolated from Aquatic Animal *Ostrea gigas* Thunberg. *Foods.* 2022 Nov 23;11(23):3777. DOI: 10.3390/foods11233777
60. Kang CH, Shin Y, Yu H, Kim S, So JS. Antibiotic and heavy-metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Mar Pollut Bull.* 2018 Oct;135:69-74. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.07.007
61. Kumarage PM, Majeed S, De Silva LADS, Heo GJ. Detection of virulence, antimicrobial resistance, and heavy metal resistance properties in *Vibrio anguillarum* isolated from mullet (*Mugil cephalus*) cultured in Korea. *Braz J Microbiol.* 2023 Mar;54(1):415-425. DOI: 10.1007/s42770-023-00911-9
62. Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, et al. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River Estuary, China. *BMC Microbiol.* 2013 Sep 30;13:214. DOI: 10.1186/1471-2180-13-214
63. Xu M, Wu J, Chen L. Virulence, antimicrobial and heavy metal tolerance, and genetic diversity of *Vibrio cholerae* recovered from commonly consumed freshwater fish. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019 Sep;26(26):27338-27352. DOI: 10.1007/s11356-019-05287-8
64. Fu H, Yu P, Liang W, Kan B, Peng X, Chen L. Virulence, Resistance, and Genomic Fingerprint Traits of *Vibrio cholerae* Isolated from 12 Species of Aquatic Products in Shanghai, China. *Microb Drug Resist.* 2020 Dec;26(12):1526-1539. DOI: 10.1089/mdr.2020.0269
65. Bueno E, Pinedo V, Shinde DD, Mateus A, Typas A, Savitski MM, et al. Transient Glycolytic Complexation of Arsenate Enhances Resistance in the Enteropathogen *Vibrio cholerae*. *mBio.* 2022 Oct 26;13(5):e0165422. DOI: 10.1128/mbio.01654-22
66. Zhang B, Xu J, Sun M, Yu P, Ma Y, Xie L, et al. Comparative secretomic and proteomic analysis reveal multiple defensive strategies developed by *Vibrio cholerae* against the heavy metal (Cd²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺) stresses. *Front Microbiol.* 2023 Oct 26;14:1294177. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1294177

Информация о соавторе:

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

Information about co-author:

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

НОВОСТИ НАУКИ

Новые инструменты для разработки препаратов против *Acinetobacter*

Устойчивость к противомикробным препаратам (AMR) у *Acinetobacter baumannii* является неудовлетворенной медицинской потребностью. Множественные лекарственно-устойчивые/чрезвычайно лекарственно-устойчивые штаммы *A. baumannii* не демонстрируют хорошего роста в моделях *in vivo*, и, следовательно, их реакция на антибактериальную терапию непоследовательна. Проблема была решена путем внедрения мотивов устойчивости к карбапенемам в высоковирулентный генетический фон *A. baumannii* AB5075. Этот штамм имеет хромосомно-кодируемый оха-23, который был удален (Δоха-23), затем были введены плазмиды, экспрессирующие оха-23, оха-24/40, оха-58, *imp-1*, *vim-2* и *ndm-1*, для создания мутантных штаммов. Каждый трансформант использовался в качестве контрольного штамма в модели нейтропенической инфекции бедра у мышей и оценивался по степени роста и реакции на меропенем

200 мг/кг подкожно каждые 6 ч (q6h). Фармакодинамические анализы проводились путем преобразования воздействия препарата из дозы (мг/кг) в долю интервала дозирования; концентрации свободного меропенема были > минимальной ингибирующей концентрации (МИК) (fT > МИК). AB5075 и мутант AB5075Δоха-23 имели МИК 32 и 4 мг/л соответственно. Трансформанты, несущие оксациллиназы оха-24/40 и оха-58, имели МИК 64 мг/л. Металло-β-лактамазы *imp-1*, *vim-2* и *ndm-1* имели МИК 128, 64 и 64 мг/л соответственно. Все трансформанты, обработанные растворителем, показали рост *in vivo* в диапазоне 0,75–1,4 log. Реакция на меропенем соответствовала изменяющемуся fT > MIC трансформантов и легко описывалась ингибирующим сигмоидным отношением Emax. Стазис был достигнут при fT > MIC 0,36. Эти трансформанты *A. baumannii* являются бесценными новыми инструментами для оценки соединений против *Acinetobacter* и открывают новый путь для обеспечения готовности к AMR.



Dubey V, Farrington N, Harper N, Johnson A, Horner I, Stevenson A, et al. *Acinetobacter baumannii* transformants expressing oxacillinases and metallo-β-lactamases that confer resistance to meropenem: new tools for anti-*Acinetobacter* drug development and AMR preparedness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024 Aug 27:e0022224. DOI: 10.1128/aac.00222-24

Энтерококковые инфекции у коронавирусных больных

Е.Е.Пославская

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

Лечение инфекционных заболеваний энтерококковой этиологии – серьезная современная медицинская проблема. Энтерококки являются причиной тяжелых инфекционных процессов различной локализации. Микроорганизм *Enterococcus faecium* включен в группу ESKAPE-патогенов. В последние годы повышенный интерес к энтерококкам объясняется еще одной существенной проблемой: у пациентов с коронавирусной инфекцией часто выявляются сопутствующие энтерококковые инфекции, что значительно осложняет состояние больных. В настоящем обзоре обобщены данные по этому вопросу.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, энтерококки, ESKAPE-патогены, COVID-19, SARS-CoV-2

Для цитирования: Пославская Е.Е. Энтерококковые инфекции у коронавирусных больных. Бактериология. 2024; 9(3): 105–109. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-105-109

Enterococcal infections in coronavirus patients

Е.Е.Poslavskaya

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

Treatment of infectious diseases of enterococcal etiology is a serious problem of modern medicine. Enterococci cause severe infectious processes in various locations. Microorganism *Enterococcus faecium* is included in the group of ESKAPE pathogens. In recent years, interest in enterococcus has increased, due to another important problem. In patients with coronavirus infection, concomitant enterococcal infections are often detected, which significantly complicates the patient's condition. This review summarizes the data on this issue.

Key words: coronavirus infection, enterococcus, ESKAPE pathogens, COVID-19, SARS-CoV-2

For citation: Poslavskaya E.E. Enterococcal infections in coronavirus patients. Bacteriology. 2024; 9(3): 105–109. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-105-109

В настоящее время лечение инфекционных заболеваний энтерококковой этиологии представляет собой серьезную медицинскую проблему. Условно-патогенные представители рода *Enterococcus* часто являются причиной тяжелых инфекционных процессов различной локализации (эндокардит, инфекции мочеполовой системы, остеомиелит, септический артрит, бактериемии, дивертикулит, менингит, инфекции дыхательных путей, эндофтальмит и др.) [1, 2].

В ряде исследований были выявлены различные факторы вирулентности энтерококков, которые кодируются генами островков патогенности клеточного генома. На сегодняшний день известно, что патогенность энтерококков обусловлена такими агентами, как гемолизин, желатиназа, энтерококковый поверхностный белок, агрегативная субстанция, кап-

сульные полисахариды, углеводы клеточной стенки и супероксид [3].

Наибольшее клиническое значение имеют патогены *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*. Для энтерококков характерен высокий уровень резистентности к антибиотикам. Микроорганизм *E. faecium* включен в группу микроорганизмов, сложных для терапии антимикробными веществами – ESKAPE (аббревиатура названий бактерий *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.). Всемирная организация здравоохранения включила в эту группу наиболее проблемные и опасные микроорганизмы, обладающие множественной лекарственной устойчивостью и не поддающихся антибиотикотерапии.

Для корреспонденции:

Пославская Евгения Е., младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 29.01.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Evgenia E. Poslavskaya, Junior Researcher of the department of collection strains, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

The article was received 29.01.2024, accepted for publication 30.09.2024

Энтерококки в желудочно-кишечном тракте у пациентов с COVID-19

В ряде исследований были продемонстрированы существенные качественные и количественные изменения микробиома кишечника у пациентов с коронавирусной инфекцией. Отмечено уменьшение содержания полезных представителей нормофлоры и увеличение концентрации потенциальных патогенов (в т.ч. энтерококков) в кишечном биотопе таких больных. Известно, что кишечный эпителий является одним из регуляторов «микробного равновесия» в биотопе желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [4]. Вопрос о возможности взаимодействия коронавируса SARS-CoV-2 с клетками кишечного эпителия находится в центре внимания нескольких исследовательских групп. Первые результаты о выделении интактных частиц коронавируса из экскрементов пациентов с COVID-19 были представлены китайскими учеными уже в феврале 2020 г. – чуть более чем через месяц после начала эпидемии [5, 6]. Несколько позже исследователи США продемонстрировали способность вируса SARS-CoV-2 воспроизводиться в клетках кишечного эпителия человека. Эксперименты проводились на так называемых энтероидных культурах тканей. Из стволовых клеток тонкого кишечника были выращены эпителиальные энтероиды, содержащие различные типы клеток кишечного эпителия. Показана способность этих клеток экспрессировать рецептор коронавируса ACE2 и сериновые протеазы, необходимые для проникновения вируса. В зараженных эпителиальных клетках SARS-CoV-2 успешно реплицируется [7]. Чуть позже китайские ученые провели аналогичные эксперименты с энтероидами человека и летучей мыши [8]. Подтверждена способность SARS-CoV-2 воспроизводиться в кишечном эпителии. Кроме того, было показано, что в зараженных клетках увеличивается концентрация интерферонов III типа и цитокинов. Авторы связывают эти проявления с кишечными симптомами у больных COVID-19 [8]. Обе группы исследователей в отдельных сериях опытов смогли выделить полноценные вирусные частицы SARS-CoV-2 из экскрементов пациентов с COVID-19 [7, 8].

Резонно предположить, что нарушение целостности кишечного эпителия влечет за собой изменения двух его важных функций:

- нарушается функция эпителия как регулятора кишечного микробиома;
- вследствие дисфункции кишечного барьера в кровь больного могут попадать бактерии ЖКТ.

Не вызывает сомнений тот факт, что дисбаланс кишечной микробиоты приводит к пролиферации патогенов. Давно отмечено, что нарушение микробиома ЖКТ часто является причиной заболеваний, вызываемых энтерококками, клостридиями и представителями семейства *Enterobacteriaceae* [9].

В ряде работ описано, что у больных с COVID-19 в кишечной микробиоте происходит изменение соотношения микробных субпопуляций в направлении увеличения содержания энтерококков и некоторых других условно-патогенных бактерий. Так, исследования, проводимые в Гонконге (Китай), позволили выявить дисбиоз кишечника у 15 обследованных COVID-19-пациентов. По данным метагеномного анализа в фекальных образцах обнаружено сниженное по сравнению с нормальными показателями содержание представителей семейств *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* и

Oscillospiraceae. В частности, отмечены низкие концентрации бактерий, производящих бутират (роды *Faecalibacterium* и *Roseburia*). Вместе с тем в изученных образцах доминировали условно-патогенные энтерококки, клостридии, энтеробактерии и бактериоиды [10].

Случаи дисбиоза кишечника у 57 пациентов с COVID-19 описаны в аналогичном исследовании другой группы китайских ученых [11]. Авторы описали тяжелое состояние таких больных. В образцах экскрементов пациентов констатировано существенное снижение содержания бутират-продуцирующих бактерий (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium butyricum* и *Eubacterium rectale*). В целом в материалах обнаружено повышенное содержание энтерококков и энтеробактерий [11].

Примечательна работа, опубликованная учеными Медицинской школы Массачусетского университета. Авторы предлагают использовать данные бактериологического анализа фекалий для дальнейшего прогнозирования состояния COVID-19-больного.

Доминирование в экскрементах микроорганизма *E. faecalis* неизбежно приводит к ухудшению состояния пациента. Такой вывод ученые сделали на основе изучения 69 больных с COVID-19 [12].

В исследовании [13] бактериологический анализ фекальных образцов 187 пациентов с диагнозом COVID-19 был дополнен изучением их сывороток на наличие отдельных воспалительных факторов. Одна из групп включала пациентов с артериальной гиперемией, во второй группе были COVID-19-больные без проявлений жара. У больных с жаром обнаружено повышенное содержание в экскрементах патогена *E. faecalis* и увеличение концентраций в сыворотке цитокинов (интерлейкин-6, -10), лейкоцитов, нейтрофилов, D-димера (показатель тромбообразования) и индикаторов повреждения тканей и клеток (LDH, CAP) [13].

Исследования, проведенные в Италии, подтверждают вывод о корреляции между кишечным дисбиозом и осложнением состояния пациентов с коронавирусной инфекцией [14]. Бактериальный профиль 69 образцов экскрементов тяжелобольных пациентов изучался на основе 16S-метагеномики. Отмечена значительная реакция в микробиоме представителей семейств *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*. Продуцируемые ими короткоцепочечные жирные кислоты играют важную роль в модуляции иммунных и воспалительных реакций. С другой стороны, в анализируемых образцах было обнаружено завышенное содержание условно-патогенных бактерий семейств *Enterococcaceae*, *Coriobacteriaceae* и *Staphylococcaceae*. В частности, в фекалиях превалировал патоген *E. faecium* [14].

Интересные данные представлены в работе Venzon [15]. В исследовании ученых из США было поставлено несколько задач:

- исследовать микробиом кишечника мышей, зараженных SARS-CoV-2;
- изучить морфологические изменения кишечного эпителия зараженных вирусом животных;
- провести бактериологический анализ экскрементов у 96 пациентов, зараженных COVID-19;
- исследовать образцы крови тех же пациентов на наличие микробной контаминации.

По полученным данным, у всех зараженных вирусом мышей обнаружен дисбиоз кишечника. При этом у экспериментальных животных кардинально изменен кишечный эпителий. Микроскопия гистологических срезов тканей позволила выявить в эпителии редукцию клеток Панета, обеспечивающих антибактериальную защиту. У оставшихся клеток Панета констатированы частичные разрушения.

Бактериологический анализ фекалий всех COVID-19-пациентов показал превалирование в микробиоме микроорганизмов семейств *Enterococcaceae* и *Enterobacteriaceae*. У 95 больных обнаружены инфекции кровотока, вызываемые патогенами этих же семейств. Авторы сделали заключение, согласно которому разрушение клеток кишечного эпителия обеспечивает транслокацию бактерий из кишечника в кровоток [15].

Энтерококковые инфекции кровотока у коронавирусных больных

Исследования, проведенные в Северной Греции [16], показали, что основными этиологическими агентами инфекций кровотока у больных с COVID-19 являются энтеробактерии и энтерококки. В 122 образцах крови от пациентов с бактериемией выявлено 166 штаммов патогенов, среди которых чаще всего обнаруживались *Acinetobacter baumannii* (51 штамм), *Klebsiella pneumoniae* (45 штаммов) и *E. faecium* (31 штаммов) [16]. Очень похожие результаты получили ученые из Индии, обследовавшие 64 COVID-19-пациентов с инфекциями кровотока. Отмечено, что при вторичных бактериальных инфекциях состояние больных изменяется в сторону ухудшения [17]. Следует учитывать, что вторичные инфекции кровотока пациентов с коронавирусной инфекцией могут быть вызваны не только бактериями, но и патогенными грибами. Возможны также сочетания бактериально-грибных осложнений. Об этом свидетельствуют данные, опубликованные в двух статьях итальянских ученых [18, 19]. В работе Signorini [18] были обследованы 92 пациента с COVID-19 из отделений интенсивной терапии. У 16 из них обнаружили бактериальные инфекции кровотока, вызываемые метициллинрезистентными стафилококками, энтерококками и стрептококками (8, 6 и 2 случая соответственно). Вместе с тем из 41 анализируемого образца были изолированы грибы *Candida albicans* и *Candida nonalbicans* [18].

Posteraro [19] также удалось выделить грибы рода *Candida* из образцов крови тяжелобольных пациентов с COVID-19 (Рим, Италия). Однако более часто из крови пациентов выделяли патогенны *S. aureus* (32,8% всех изолятов), представителей семейства *Enterobacteriaceae* (20,7%), *E. faecalis* (17,2%), грибов *Candida* (13,8%) и *P. aeruginosa* (10,3%). Авторы подчеркивают высокий уровень смертности среди COVID-19-больных со вторичными инфекциями кровотока [19].

Тяжелое состояние COVID-19-больных с инфекциями кровотока энтерококковой этиологии описано в работе Giacobbe [20]. В одном из госпиталей Генуи (Италия) были зарегистрированы 223 пациента с COVID-19. Позже были переведены в отделение интенсивной терапии 43 больных, находящихся в критическом состоянии. У 29 из них вторичная инфекция кровотока была вызвана патогеном *E. faecalis*, у 22 – *E. faecium* [20].

Высок уровень частоты контаминации кровотока энтерококками у пациентов с коронавирусной инфекцией и в рабо-

те Bonazzetti [21]. Из 89 обследованных пациентов с COVID-19 у 60 была обнаружена бактериемия (Милан, Италия). Бактериологический анализ позволил выделить 117 изолятов патогенов из образцов крови пациентов. Большинство из них (53 штамма) – энтерококки. В частности, идентифицированы 26 штаммов *E. faecium*, 26 штаммов *E. faecalis* и 1 изолят *Enterococcus hirae*. Несколько меньше выявлено коагулазонегативных стафилококков (24 штамма), энтеробактерий (19 штаммов) и грибов рода *Candida* (2 изолята). Авторы также предполагают, что патогены проникают в кровоток из кишечника [21].

Энтерококковые инфекции мочеполовой системы у пациентов с коронавирусной инфекцией.

Одно из первых исследований, в котором представлены данные о вторичных бактериальных инфекциях мочеполовой системы у пациентов с коронавирусной инфекцией, было проведено Garcia-Vidal [22]. У четырех из обследованных 72 пациентов из образцов мочи выделен патоген *E. faecium* [22]. При обследовании пациентов с COVID в Объединенных Арабских Эмиратах также в ряде случаев были констатированы инфекции мочеполовой системы. Один из этиологических агентов этих инфекций – патоген *E. faecalis* [23]. В работе [24] убедительно продемонстрировано, что у COVID-19-больных значительно увеличивается риск развития урологических инфекций, вызываемых энтерококками (*E. faecalis* и *E. faecium*) [24]. В исследовании, проведенным Бычинским с соавт. (Москва) анализировались нозокомиальные инфекции у пациентов с тяжелым COVID-19. В результате было показано, что этиологическими агентами урогенитальных инфекций таких больных чаще всего являются бактерии *E. faecalis* и *E. faecium* [25].

Заключение

Входные ворота коронавирусной инфекции – эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты ЖКТ. Процесс проникновения вируса в верхние и нижние отделы дыхательной системы хорошо изучен. Вместе с тем вопрос о механизмах поступления SARS-CoV-2 в ЖКТ дискутируется до настоящего времени. В этой связи примечательна публикация Sun [26], в которой китайские ученые представили данные об изменении свойств COVID-19 в средах с низкими показателями pH. Показано, что коронавирус не утрачивает активность после инкубации в растворе с pH 2,2 в течение 60 мин [26]. Таким образом, есть основания для предположения, что COVID-19 может преодолевать кислотный барьер желудка и проникать далее в кишечник. С другой стороны, следует учитывать то обстоятельство, что у многих людей (преимущественно пожилых) кислотность желудка может быть значительно понижена, что обуславливает риск заражения инфекционными агентами (вирусами, бактериями, грибами).

Коронавирусное инфицирование кишечника влечет за собой радикальные изменения кишечной микробиоты. COVID-19 не взаимодействует с бактериальными клетками. Количественные и качественные изменения микробиома являются следствием дисфункции его регуляторов. Один из основных регуляторов микробного баланса кишечника – иммунная система организма [27]. Давно известно, что у пациентов с признаками иммунодефицита развивается дисбиоз

кишечника. Это было показано в ряде исследований больных с онкологическими заболеваниями. У таких пациентов в кишечной микрофлоре преобладали энтерококки и протеобактерии [28–31].

На сегодня можно считать доказанным, что коронавирусная инфекция сопровождается снижением уровня иммунной защиты организма. В частности показано, что у пациентов с коронавирусной инфекцией диагностируется лимфопения [32, 33]. Таким образом, иммунологическая дисфункция – одна из причин дисбактериоза ЖКТ. Еще одним регулятором микробиома является кишечный эпителий [4]. Коронавирус изменяет его целостность, инфицируя эпителиоциты [7, 8, 15]. Дополнительной причиной дисбиоза ЖКТ может стать применение антибиотиков, в случае если COVID-19-пациенту назначали антибиотикотерапию. Очень часто это назначение не ориентировано на конкретные бактерии-мишени и не обеспечивает селективную деконтаминацию патогенов.

Важно подчеркнуть, что при существенном микробном дисбалансе нарушается механизм колонизационной резистентности кишечника [34, 35]. Анализ публикаций, приведенных в настоящем обзоре, позволяет сделать заключение, что в кишечном микробиоме COVID-19-пациентов доминируют энтерококки и энтеробактерии. Микроорганизмы способны проникать в кровоток из-за частичной деструкции кишечного эпителия. Вторичные бактериальные инфекции кровотока осложняют состояние COVID-19-пациентов. Чаще всего этиологическими агентами таких инфекций являются представители семейств *Enterococcaceae* и *Enterobacteriaceae*. По кровеносным сосудам бактерии могут далее проникать в любые органы. В настоящем обзоре отмечены энтерококковые инфекции мочеполовой системы SARS-CoV-2-больных. В будущем предстоит выяснить другие проявления патогенного действия *E. faecium* и *E. faecalis* у коронавирусных пациентов.

Потенциальную опасность вторичных энтерококковых инфекционных осложнений после коронавирусной инфекции следует учитывать при выборе антимикробных лечебно-профилактических средств (бактериофагов, бактериоцинов, антибиотиков, пробиотиков, литических ферментов). В этих условиях использование специализированных препаратов, селективных в отношении конкретных микроорганизмов, является предпочтительным.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Афанасьева ЕН, Бочанова ЕН, Гордина ОВ, Бердиев ША, Иванова ОВ. Энтерококки: современное значение для медицинской практики.

- Современные проблемы науки и образования. 2022;2:144. / Afanasova EN, Bochanova EN, Gordina OV, Berdiev SA, Ivanova OV. Enterococcus: modern importance for medical practice. Modern Problems of Science and Education. 2022;2:144. DOI: 10.17513/spno.31555 (In Russian).
2. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology (Reading). 2009 Jun;155(Pt 6):1749-1757. DOI: 10.1099/mic.0.026385-0
3. Миронова АВ. Факторы вирулентности энтерококков. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015;4(часть 1):67-70. / Mironova AV. Virulence factors of enterococci. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2015;4(часть 1):67-70. (In Russian).
4. Zhou A, Yuan Y, Yang M, Huang Y, Li X, Li S, et al. Crosstalk Between the Gut Microbiota and Epithelial Cells Under Physiological and Infectious Conditions. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jan 27;12:832672. DOI: 10.3389/fcimb.2022.832672
5. Zhang Y, Chen C, Zhu S, Shu C, Wang D, Song J, et al. Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). China CDC Wkly. 2020 Feb 21;2(8):123-124.
6. Xu K, Cai H, Shen Y, Ni Q, Chen Y, Hu S, et al. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2020;49(2):147-157. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2020.02.02
7. Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, Zeng Q, Rothlauf PW, Sonnek NM, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. Sci Immunol. 2020 May 13;5(47):eabc3582. DOI: 10.1126/sciimmunol.abc3582
8. Zhou J, Li C, Liu X, Chiu MC, Zhao X, Wang D, et al. Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2. Nat Med. 2020 Jul;26(7):1077-1083. DOI: 10.1038/s41591-020-0912-6
9. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. Nat Rev Immunol. 2013 Nov;13(11):790-801. DOI: 10.1038/nri3535
10. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. Gastroenterology. 2020 Sep;159(3):944-955.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.05.048
11. Tang L, Gu S, Gong Y, Li B, Lu H, Li Q, et al. Clinical Significance of the Correlation between Changes in the Major Intestinal Bacteria Species and COVID-19 Severity. Engineering (Beijing). 2020 Oct;6(10):1178-1184. DOI: 10.1016/j.eng.2020.05.013
12. Ward D, Bhattarai S, Rojas-Correa M, Purkayastha A, Holler D, Qu M, et al. The intestinal and oral microbiomes are robust predictors of COVID-19 severity the main predictor of COVID-19-related fatality. Preprint, 2021. University of Massachusetts Chan Medical School Faculty Publications. DOI: 10.1101/2021.01.05.20249061
13. Zhou Y, Shi X, Fu W, Xiang F, He X, Yang B, et al. Gut Microbiota Dysbiosis Correlates with Abnormal Immune Response in Moderate COVID-19 Patients with Fever. J Inflamm Res. 2021 Jun 17;14:2619-2631. DOI: 10.2147/JIR.S311518
14. Gaibani P, D'Amico F, Bartoletti M, Lombardo D, Rampelli S, Fornaro G, et al. The Gut Microbiota of Critically Ill Patients With COVID-19. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Jun 29;11:670424. DOI: 10.3389/fcimb.2021.670424
15. Venzon M, Bernard-Raichon L, Klein J, Axelrad JE, Zhang C, Hussey GA, et al; Yale IMPACT Research Team. Gut microbiome dysbiosis during COVID-19 is associated with increased risk for bacteremia and microbial translocation. bioRxiv [Preprint]. 2022 Mar 2:2021.07.15.452246. DOI: 10.1101/2021.07.15.452246
16. Protonotariou E, Mantzana P, Meletis G, Tychala A, Kassomenaki A, Vasilaki O, et al. Microbiological characteristics of bacteremias among COVID-19 hospitalized patients in a tertiary referral hospital in Northern Greece during the second epidemic wave. FEMS Microbes. 2021 Dec 2;2:xtab021. DOI: 10.1093/femsmc/xtab021
17. Palanisamy N, Vihari N, Meena DS, Kumar D, Midha N, Tak V, et al. Clinical profile of bloodstream infections in COVID-19 patients: a retrospective cohort study. BMC Infect Dis. 2021 Sep 8;21(1):933. DOI: 10.1186/s12879-021-06647-x

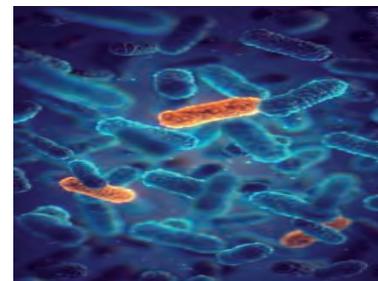
18. Signorini L, Moioli G, Calza S, Van Hauwermeiren E, Lorenzotti S, Del Fabro G, et al. Epidemiological and Clinical Characterization of Superinfections in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Crit Care Explor.* 2021 Jun 11;3(6):e0430. DOI: 10.1097/CCE.0000000000000430
19. Posteraro B, De Angelis G, Menchinelli G, D'Inzeo T, Fiori B, De Maio F, et al. Risk Factors for Mortality in Adult COVID-19 Patients Who Develop Bloodstream Infections Mostly Caused by Antimicrobial-Resistant Organisms: Analysis at a Large Teaching Hospital in Italy. *J Clin Med.* 2021 Apr 17;10(8):1752. DOI: 10.3390/jcm10081752
20. Giacobbe DR, Labate L, Tutino S, Baldi F, Russo C, Robba C, et al. Enterococcal bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19: a case series. *Ann Med.* 2021 Dec;53(1):1779-1786. DOI: 10.1080/07853890.2021.1988695
21. Bonazzetti C, Morena V, Giacomelli A, Oreni L, Casalini G, Galimberti LR, et al. Unexpectedly High Frequency of Enterococcal Bloodstream Infections in Coronavirus Disease 2019 Patients Admitted to an Italian ICU: An Observational Study. *Crit Care Med.* 2021 Jan 1;49(1):e31-e40. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004748
22. Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, Garcia-Pouton N, Chumbita M, et al.; COVID-19 Researchers Group. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Jan;27(1):83-88. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.07.041
23. Senok A, Alfaresi M, Khansaheb H, Nassar R, Hachim M, Al Suwaidi H, et al. Coinfections in Patients Hospitalized with COVID-19: A Descriptive Study from the United Arab Emirates. *Infect Drug Resist.* 2021 Jun 21;14:2289-2296. DOI: 10.2147/IDR.S314029
24. Cultrera R, Barozzi A, Libanore M, Marangoni E, Pora R, Quarta B, et al. Co-Infections in Critically Ill Patients with or without COVID-19: A Comparison of Clinical Microbial Culture Findings. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Apr 20;18(8):4358. DOI: 10.3390/ijerph18084358
25. Bychinin M, Antonov I, Klypa T, Mandel A, Minets A, Kolyshkina N, et al. Nosocomial infection in patients with severe and critical COVID-19. *General Reanimatology.* 2022;18;1. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-1-4-10
26. Sun Z, Cai X, Gu C, Zhang R, Han W, Qian Yu, et al. Stability of the COVID-19 virus under wet, dry and acidic conditions. Preprint from medRxiv, April, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.09.20058875
27. Willing BP, Gill N, Finlay BB. The role of the immune system in regulating the microbiota. *Gut Microbes.* 2010 Jul;1(4):213-223. DOI: 10.4161/gmic.1.4.12520
28. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct;55(7):905-14. DOI: 10.1093/cid/cis580
29. Taur Y, Coyte K, Schluter J, Robilotti E, Figueroa C, Gjonbalaj M, et al. Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Sci Transl Med.* 2018 Sep 26;10(460):eaap9489. DOI: 10.1126/scitranslmed.aap9489
30. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2020 Feb 27;382(9):822-834. DOI: 10.1056/NEJMoa1900623
31. Liao C, Taylor BP, Ceccarani C, Fontana E, Amoretti LA, Wright RJ, et al. Compilation of longitudinal microbiota data and hospitalome from hematopoietic cell transplantation patients. *Sci Data.* 2021 Mar 2;8(1):71. DOI: 10.1038/s41597-021-00860-8
32. Tavakolpour S, Rakhshandehroo T, Wei EX, Rashidian M. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *Immunol Lett.* 2020 Sep;225:31-32. DOI: 10.1016/j.imlet.2020.06.013
33. Wang X, Xu W, Hu G, Xia S, Sun Z, Liu Z, et al. RETRACTED ARTICLE: SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion. *Cell Mol Immunol.* 2020 Apr 7;20(5):554. DOI: 10.1038/s41423-020-0424-9
34. Khan I, Bai Y, Zha L, Ullah N, Ullah H, Shah SRH, et al. Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Dec 23;11:716299. DOI: 10.3389/fcimb.2021.716299
35. Leshem A, Liwinski T, Elinav E. Immune-Microbiota Interplay and Colonization Resistance in Infection. *Mol Cell.* 2020 May 21;78(4):597-613. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.03.001

НОВОСТИ НАУКИ

Эффективное средство против бактерий, устойчивых к нескольким классам антибиотиков

Результаты исследований показали, что новый класс антибиотиков, состоящий из макроциклических пептидов, был продемонстрирован в экспериментах *in vivo* и *in vitro* для эффективного лечения инфекций, вызванных штаммами *A. baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью и устойчивостью к карбапенемам.

Кроме того, полученные результаты заложили основу для клинических испытаний на людях с целью проверки безопасности и эффективности зосурабальпина, макроциклического пептида, для лечения устойчивых к лекарствам инфекций *Acinetobacter* у людей. Эти антибиотики лечат инфекцию, улавливая транспортный комплекс липополисахарид-LptB2FGC и предотвращая его экспорт липополисахарида на внешнюю мембрану.



- Pahil KS, Gilman MSA, Baidin V, Clairfeuille T, Mattei P, Bieniossek C, et al. A new antibiotic traps lipopolysaccharide in its intermembrane transporter. Nature. 2024 Jan;625(7995):572-577. DOI: 10.1038/s41586-023-06799-7 <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06799-7>*
- Zampaloni C, Mattei P, Bleicher K, Winther L, Thäte C, Bucher C, et al. A novel antibiotic class targeting the lipopolysaccharide transporter. Nature. 2024 Jan;625(7995):566-571. DOI: 10.1038/s41586-023-06873-0*

Особенности моделирования сибирской язвы с использованием различных видов мелких лабораторных животных

К.В.Хлопова, Г.М.Титарева, И.В.Бахтеева, Т.Б.Кравченко, В.С.Тимофеев

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

Сибирская язва – особо опасный зооантропоноз, вызываемый грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Это заболевание встречается преимущественно у копытных травоядных животных, в т.ч. используемых в сельском хозяйстве, но может поражать и человека. Но для моделирования сибирской язвы, способов ее лечения и профилактики приходится использовать более доступные биологические модели мелких грызунов и кроликов, которые по своей чувствительности к инфекции и особенностям инфекционного процесса отличаются от копытных и людей. В данной статье мы приводим обзор литературных источников, в которых описываются эпидемиологические и клинические особенности сибиреязвенной инфекции у наиболее распространенных лабораторных животных и особенности использования этих животных для моделирования сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, *Bacillus anthracis*, эпидемиология, моделирование инфекции

Для цитирования: Хлопова К.В., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Тимофеев В.С. Особенности моделирования сибирской язвы с использованием различных видов мелких лабораторных животных. Бактериология. 2024; 9(3): 110–117. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-110-117

Features of modeling anthrax on various types of small laboratory animals

K.V.Khlopova, G.M.Titareva, I.V.Bakhteeva, T.B.Kravchenko, V.S.Timofeev

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

Anthrax is a particularly dangerous zooanthroponosis caused by the gram-positive spore-forming bacterium *Bacillus anthracis*. This disease occurs primarily in ungulate herbivorous, including those used in livestock farming, but can also affect humans. But for modeling anthrax and its treatment and prevention methods, it is necessary to use more accessible biological models of rodents and rabbits, which differ in their sensitivity to infection and the characteristics of the infectious process from ungulates and humans. In this article, we provide an overview of literature sources that describe the epidemiological and clinical features of anthrax infection in the most common laboratory animals and the features of using these animals for modeling anthrax.

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis*, epidemiology, infection modeling

For citation: Khlopova K.V., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Timofeev V.S. Features of modeling anthrax on various types of small laboratory animals. Bacteriology. 2024; 9(3): 110–117. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-110-117

Сибирская язва – особо опасное заболевание животных и человека, вызываемое грамм-положительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Патогенность *B. anthracis* обеспечивается наличием двух плазмид – рХО1 и рХО2, несущих генетические детерминанты основных факторов патогенности. На плазмиде рХО1 расположены гены, кодирующие сибиреязвенный токсин, состоящий из трех компонентов – протективного антигена (protective

antigen/PA), летального фактора (lethal factor/LF) и отеочного фактора (edema factor/EF). LF представляет собой цинк-зависимую металлопротеиназу, расщепляющую N-конец митоген-активируемых киназ (MAPKKs или MEKs) клетки хозяина, нарушая при этом сигнальные пути регуляции пролиферации и защиты клеток от стресса. EF – кальмодулин-зависимая аденилатциклаза. Увеличивая уровни циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), EF влияет на сигналь-

Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-27

Статья поступила 01.02.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Vitaly S. Timofeev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly 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) 36-00-27

The article was received 01.02.2024, accepted for publication 30.09.2024

ные пути клетки-хозяина. Клинически действие EF проявляется как отек тканей. PA представляет собой порообразующий белок, который образует комплекс с LF или EF, называемые соответственно летальным токсином (LT) и отечным токсином (ET). Связываясь с клеточными рецепторами (TEM8 и CMG2), PA опосредует проникновение LF или EF в цитозоль клеток млекопитающих [1–3]. На плазмиде pXO2 расположен оперон *capBCAED*, кодирующий ферменты синтеза капсулы, состоящей из поли-D-γ-глутаминовой кислоты. Капсула покрывает поверхность вегетативной клетки *B. anthracis*, защищая ее от иммунных реакций хозяина [4].

Вторая ключевая для эпидемиологии сибирской язвы особенность *B. anthracis* – это присущая данному патогену, как представителю рода *Bacillus*, способность к формированию эндоспор, крайне устойчивых в окружающей среде [5, 6]. В естественных условиях жизненный цикл *B. anthracis* выглядит следующим образом. Проникая в организм хозяина, споры прорастают в вегетативные клетки, которые затем растут и размножаются в точке проникновения или в ближайших лимфатических тканях. Затем, если болезнь переходит в следующую стадию, они распространяются по организму лимфогематогенным путем и вызывают геморрагические некротические поражения, токсемию и сепсис, которые могут привести к смерти. После этого вегетативные клетки, оставшиеся в трупe хозяина, погибают при его разложении под действием гнилостной микрофлоры. Но часть из них попадает в окружающую среду, в первую очередь в почву, вместе с кровянистыми выделениями из тела на последних стадиях инфекции и в ближайшее время после смерти, а также при поедании трупа падальщиками, которые устойчивы к заражению. Из попавших в почву клеток *B. anthracis* часть спорится, и, таким образом, жизненный цикл патогена замыкается, а вновь образованные споры способны вызвать новый цикл заражения. При этом они сохраняют жизнеспособность и, что более важно, вирулентность десятки и даже сотни лет, в течение которых место гибели животного от сибирской язвы сохраняет эпидемический потенциал, т.е. может быть источником новых вспышек заболевания [7, 8].

Интересными особенностями эпидемиологии сибирской язвы являются: 1) дифференциальная чувствительность к заболеванию разных таксономических групп животных; 2) обратная корреляция между устойчивостью к сибиреязвенной инфекции (способность препятствовать проникновению в организм и развитие в нем возбудителя) и устойчивостью к действию сибиреязвенного токсина [9, 10]. Наиболее чувствительная к инфекции группа животных, среди которых она преимущественно циркулирует, – это копытные травоядные. Заражение происходит в основном при поедании загрязненного спорами *B. anthracis* корма, в естественных условиях – это загрязненная почва, налипшая на корни вырываемых пасущимся животным растений. Так как эта группа животных составляет основу сельского хозяйства, люди, контактирующие с ними, также подвергаются риску заражения. Хотя человек и считается относительно устойчивым к заражению сибирской язвой, существует высокий риск летального исхода, особенно при желудочно-кишечной и легочной формах заболевания.

В антропогенных экосистемах эпидемиология сибирской язвы значительно сложнее. Во-первых, существенно возрастает

опасность алиментарного заражения, так как особенности современных технологических процессов и логистики могут привести к тому, что одно заболевшее животное станет источником заражения большого количества животных (с пищевыми добавками животного происхождения) или людей, рассредоточенных на значительных территориях. Вторых, высокую значимость приобретают другие формы инфекции – кожная и ингаляционная, возникающие, соответственно, при непосредственном контакте с зараженным животным или при переработке контаминированной продукции и при аэрозолировании материала, содержащего споры *B. anthracis*, и вдыхании таких аэрозолей.

Обобщая, мы можем сказать, что в большинстве случаев сибирская язва протекает как алиментарная инфекция копытных и алиментарная, кожная и легочная инфекция человека. Но в этом и сложность изучения сибирской язвы, так как моделировать инфекцию для изучения ее патогенеза, способов лечения и вакцинопрофилактики, используя копытных и имитирующих человека приматов, в большинстве случаев невозможно по соображениям экономического и этического характера. Поэтому исследователи вынуждены использовать более распространенные и доступные биологические модели – мелких грызунов (мышей, крыс, морских свинок) и кроликов. Но эти животные не болеют сибирской язвой в природе, что уже указывает на то, что они отличаются по своей чувствительности к этому заболеванию от копытных и приматов. Более того, и при экспериментальном заражении они отличаются между собой по чувствительности к инфекции, к воздействию сибиреязвенного токсина и по особенностям инфекционного процесса. И эти особенности каждого вида (а иногда и внутривидовой группы) модельных животных необходимо учитывать при планировании каждого конкретного эксперимента. В этом обзоре мы описываем основные особенности моделирования сибирской язвы с использованием разных видов мелких лабораторных животных.

Мыши

Мыши – наиболее часто используемый вид животных в микробиологии патогенных микроорганизмов, в т.ч. и сибиреязвенного микроба. Это обусловлено малым размером и низкой стоимостью самих животных и их содержания, что снижает стоимость экспериментов и позволяет увеличить количество используемых животных, тем самым повышая статистическую достоверность полученных результатов. Кроме того, существует большое количество генетически охарактеризованных инбредных линий мышей, что позволяет подобрать наиболее подходящую для целей эксперимента линию.

Одно из наиболее существенных преимуществ мышей при моделировании сибирской язвы – это наличие инбредных линий, восприимчивых к инфекции, вызываемой бескапсульными штаммами, такими как Sterne-подобные живые вакцины – штаммы Sterne, СТИ-1, А16R и т.д. Такие штаммы относятся к 3-й группе патогенности, и работа с ними может проводиться в лабораториях, не оборудованных для работы с высокопатогенными микроорганизмами, т.е. экспериментальная работа становится доступной более широкому кругу исследователей. Однако различия в чувствительности к

pXO1+pXO2-штаммам у мышей и людей не позволяют экстраполировать полученные на мышах экспериментальные результаты на людей.

Вторым недостатком мышинной биомодели является чувствительность мышей к капсульным, но нетоксигенным штаммам, невирулентным для человека и других животных [11], причем и LD₅₀, и средний срок гибели не отличаются от этих показателей при инфицировании полноценными двухплазмидными штаммами [12–14].

И последний, но наиболее существенный недостаток мышинной биомодели – практически отсутствующая протективность при вакцинации мышей и последующем заражении двухплазмидными вирулентными штаммами *B. anthracis* (в отличие от высокой протективности у кроликов и умеренной у морских свинок) [15]. Таким образом, мышей практически невозможно использовать для исследований противосибиреязвенных вакцин напрямую, за исключением линий, чувствительных к pXO1+pXO2-штаммам, и заражения их такими штаммами. Но в ряде исследований мышей используют для «пассивной иммунизации» крупных животных, на которых нельзя напрямую оценить протективность, заразив их. В этом случае эффективность иммунизации оценивают по способности сыворотки крови вакцинированных животных, введенной мышам, защищать их от заражения *B. anthracis* [16–19].

Стоит также обратить внимание на анатомические отличия мыши от человека, которые критичны для моделирования ингаляционной инфекции, такие как: сравнительно большая площадь слизистой носа, меньшее количество ветвей дыхательных путей, отсутствие бронхиол, гораздо большее количество бронхоассоциированной ткани и слабо выраженный кашлевой рефлекс [20–22].

Как уже было отмечено выше, у различных видов млекопитающих между устойчивостью к инфекции (способностью препятствовать проникновению в организм и развитию в нем возбудителя) и устойчивостью к токсину существует обратная корреляция. Аналогичная корреляция характерна для различных линий мышей, причем именно для мышей удалось частично выявить ее причины. В патогенезе сибирской язвы значительную роль играют системы хозяина, распознающие патоген и активирующие врожденный иммунитет, такие как Toll-подобные рецепторы (TLR) и NOD-подобные рецепторы (NLR). TLR и NLR, сигнальные системы макрофагов, активируясь при воздействии клеточных компонентов микроорганизма, в данном случае *B. anthracis*, активируют сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), запускающей синтез фактора некроза опухоли- α . Летальный токсин *B. anthracis* расщепляет MAPK, блокируя указанные иммунные процессы и индуцируя апоптоз [9, 23–28].

Кроме того, синтез цАМФ отечным токсином *B. anthracis* также приводит к инактивации многих клеточных сигнальных путей. В основном именно благодаря совокупному действию указанных токсинов *B. anthracis* и преодолевает иммунитет хозяина [9]. И именно на этапе блокировки NLR-опосредованных механизмов и возникает обратная корреляция между чувствительностью к токсину и развитием инфекции. Дело в том, что белок Nlrp1b семейства NLR может кодироваться так называемым LF-чувствительным аллелем.

Этот вариант Nlrp1b^S легко расщепляется летальным токсином *B. anthracis*, что приводит к быстрому лизису макрофага, но он при этом активирует каспазу-1, которая, в свою очередь, индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β и интерлейкина-18, активизирующих нейтрофилы и моноядерные фагоциты [29–30]. Этот каскадный механизм позволяет подавить сибиреязвенный микроб, не допустив его размножения и распространения в организме, т.е. развития инфекции. И таким образом мыши, имеющие легко лизируемые летальным сибиреязвенным токсином макрофаги, оказываются в большей степени способны подавить сибиреязвенную инфекцию. И наоборот, мыши, обладающие устойчивым к токсину вариантом Nlrp1b и, соответственно, устойчивыми макрофагами, оказываются в меньшей степени способными противодействовать инфекции [9].

Как и в случае многих других заболеваний, устойчивость к сибирской язве обеспечивается многими факторами и не исчерпывается описанным выше механизмом. Значительную роль в дифференциальной чувствительности к сибирской язве у мышей также играют характерные для некоторых линий особенности функционирования системы комплемента. Более чувствительными к инфекции являются так называемые C5-линии мышей, например линии DBA/2J и A/J, дефицитные по C5-компоненту системы комплемента (кодируется локусом *Hc*), участвующему в воспалительных реакциях и мобилизации фагоцитирующих клеток. Именно C5-линии мышей оказались крайне удобной моделью для разработки и оценки эффективности вакцинных противосибиреязвенных препаратов. Эти линии чувствительны к tox⁺cap⁻штаммам *B. anthracis*, и их вакцинация с последующим заражением такими штаммами – единственная возможность оценить протективность вакцин на мышинной модели, так как добиться устойчивой протективности при заражении tox⁺cap⁻штаммами на мышах не получается, а к штаммам tox⁺cap⁺ другие линии мышей достаточно устойчивы и без вакцинации [9]. Кроме того, модель C5-мышей, заражаемых tox⁺cap⁻штаммами *B. anthracis*, как упоминалось выше, хорошо подходит для оценки эффективности иммунизации животных, экспериментальное заражение которых вирулентными штаммами невозможно по этическим и/или экономическим причинам. В этом случае сыворотку таких животных вводят C5-мышам и оценивают ее способность препятствовать заражению мышей tox⁺cap⁻штаммами *B. anthracis*, такими как Sterne [19].

Какими бы ни были механизмы, приводящие к различиям в чувствительности разных линий мышей к сибирской язве и к сибиреязвенным токсинам, для практической работы в соответствующих лабораториях важно представлять себе сравнительную степень чувствительности конкретной линии для более корректного планирования экспериментов. По чувствительности к сибирской язве основные линии мышей можно разделить на три группы: 1) чувствительные: DBA/2J, A/J; 2) сравнительно устойчивые: C3H/HeN, C57BL/6J, C3HHeJ, C57L/J, C58/J; 3) устойчивые: CBA/J, BALB/cJ, C57BR/cdJ. У чувствительных линий LD₅₀ при интраназальном или интраперитонеальном заражении одноплазмидными tox⁺cap⁻штаммами составляет 10³–10⁴ КОЕ/мышь, у устойчивых – 10⁶–10⁸ КОЕ/мышь [9].

В целом, несмотря на ряд описанных ограничений, мышьяная модель сибирской язвы остается незаменимой в качестве удобного и недорогого первого этапа исследований *in vivo*, результаты которых, тем не менее, зачастую должны быть подтверждены на других видах лабораторных животных (а в случае работы на моделях, использующих *tox*⁺сар-штаммы *B. anthracis* – еще и на полноценных двухплазмидных штаммах).

Крысы

Видовая особенность крыс как модели сибирской язвы – это высокая устойчивость к *B. anthracis* и при этом крайне выраженная чувствительность к сибиреязвенному токсину. Например, чувствительность к LF на килограмм массы тела для крыс линии Fisher составляет 120 мкг, PA – 145 мкг; LF для морских свинок – 250 мкг, PA 300 мкг; LF для мышей – 225 мкг, PA – 270 мкг. [31]. При этом чувствительность крыс к летальному токсину гораздо выше, чем у мышей, коррелирует с чувствительностью их макрофагов к лизису под действием этого токсина, которая опосредована рецептором NLR Nlrp1, крысиным гомологом мышьяного Nlrp1b [9]. Именно высокая чувствительность к летальному токсину делает крыс идеальной моделью для разработки токсин-нейтрализующих препаратов [32–35] либо препаратов, усиливающих действие LT [36]. В то же время устойчивость к инфекции делает их неподходящей моделью для опытов, предусматривающих заражение (таких как определение вирулентности, выделение штаммов через биопробу, определение эффективности вакцинных препаратов).

Морские свинки

Исторически морские свинки – одна из наиболее распространенных животных моделей сибирской язвы, используемая для оценки вирулентности штаммов, изучения механизмов патогенеза и разработки противосибиреязвенных препаратов. Обладая большим размером тела, морские свинки более удобны для гистологических и анатомических исследований. В то же время стоимость их содержания не слишком затратна [9].

Морские свинки характеризуются высокой чувствительностью к заражению *B. anthracis* и при этом довольно устойчивы к действию сибиреязвенных токсинов [37]. Общая клиническая картина сибирской язвы у морских свинок обладает рядом характерных особенностей. Во-первых, у них развивается ярко выраженная бактериемия в крови и селезенке, которая может достигать 10⁹ КОЕ/мл крови и сохраняться на постоянном уровне длительное время [38, 39]. Возможно, эта особенность возникает как следствие устойчивости к токсинам. По мере развития инфекции возрастает численность *B. anthracis* во внутренней среде организма, и пропорционально численности патогена возрастает количество выделяющихся им токсинов – до тех пор, пока это не приведет к смерти хозяина. И в этом случае устойчивость хозяина к токсинам позволяет патогену дольше наращивать свою численность, что приводит к более выраженной бактериемии. Во-вторых, у морских свинок при сибирской язве не возникает лихорадки, температура тела остается стабильной и лишь на терминальных стадиях болезни быстро снижается (в то время как у кроликов, свиней, собак и людей в

ответ на инфекцию поднимается температура, тогда как у крыс и шимпанзе не наблюдается значительных колебаний температуры во время инфекции) [40].

При использовании морских свинок в качестве биологической модели сибирской язвы важно учитывать следующие видоспецифические особенности этой модели:

1) чувствительность морских свинок к сибиреязвенной инфекции характеризуется тем, что для развития летальной инфекции достаточно, чтоб заражающий штамм обладал лишь одним из токсинов – летальным или отечным [41]. Более того, даже PA-негативные, т.е. полностью нетоксичные штаммы могут спровоцировать у морских свинок летальную инфекцию [42–43]. В то же время мутантные штаммы *B. anthracis* с нарушенными путями биосинтеза пуринов, сохраняющие вирулентность для мышей и кроликов, авирулентны для морских свинок; таким образом, морские свинки, несмотря на высокую чувствительность к сибирской язве в целом, могут оказаться устойчивыми к штаммам с особыми требованиями к наличию питательных веществ [44];

2) при исследовании на морских свинках эффективности противосибиреязвенных вакцин следует учитывать, что их вакцинация субъединичными вакцинами, такими как AVA, не приводит к высокой защищенности при последующем заражении вирулентными штаммами *B. anthracis*. Более того, было обнаружено, что различные природные штаммы *B. anthracis* способны с различной эффективностью преодолевать иммунитет, приобретенный после такой вакцинации. Это штамм-специфичная черта, корреляция которой с другими свойствами штамма, в т.ч. с вирулентностью для других лабораторных животных или географическим местом выделения этого штамма, не была выявлена [9]. Таким образом, штаммы *B. anthracis* можно дифференцировать по вирулентности для морских свинок, вакцинированных субъединичными вакцинами, но экстраполировать эти данные на других животных и человека едва ли возможно.

В то же время, в отличие от химических вакцин, при вакцинации морских свинок живыми вакцинами указанного эффекта не наблюдается, и вакцинация эффективно защищает животных от любых вирулентных штаммов сибиреязвенного микроба [45, 46];

3) морские свинки – это одна из наиболее удачных моделей для исследования иммуногенных свойств адъювантов при вакцинации от сибирской язвы, так как полученные результаты лучше экстраполируются на человека, чем, например, результаты, полученные на кроликах [47–49]. У морских свинок повышена чувствительность к некоторым антибиотикам. Это может исказить результаты экспериментов по разработке методов антибиотикотерапии инфекционных болезней, в т.ч. и сибирской язвы [50].

Кролики

Кролики, как модельное животное для исследований сибирской язвы, если так можно выразиться, занимают промежуточное положение между морскими свинками и приматами по стоимости исследований и возможности экстраполяции полученных результатов на человека. К тому же вакцинные и/или терапевтические препараты перед клиническими испытаниями должны быть охарактеризованы на

нескольких животных моделях. С учетом высокой стоимости приматов и ограниченной пригодности мышинной модели именно кролики, в паре с морскими свинками, используются для соответствующих опытов [9]. В экспериментах по моделированию сибирской язвы используются преимущественно новозеландские белые и карликовые датские (Brabander, Hollander) кролики, но в целом данные, полученные на разных линиях кроликов, коррелируют между собой, что делает подбор той или иной линии животных не столь актуальным, как при использовании мышинной модели [9]. Кролики достаточно чувствительны к сибирской язве. Среднее время жизни после заражения составляет 2–4 дня.

Главное преимущество кроличьей модели сибирской язвы заключается в схожести инфекционного процесса у кроликов и приматов, включая человека, но все же у кроликов патологические изменения чуть менее выражены. Возможно, менее выраженная патология обусловлена чувствительностью кроликов к сибирской язве – из-за малого времени жизни после заражения более серьезная симптоматика не успевает развиться [51]. Схожий ответ на инфекцию наблюдается со стороны сердечно-сосудистой (снижение артериального давления и изменение состава сыворотки крови) системы (респираторный дистресс). Также наблюдается разрушение лимфоидной ткани в селезенке и в ближайших к месту введения патогена региональных лимфатических узлах. В случае подкожного заражения поражаются подмышечные лимфатические узлы, при аэрозольном заражении – нижнечелюстные или средостенные [9, 50]. В то же время, в отличие от приматов, у кроликов редко развивается сибиреязвенный менингит. Интересно, что для его развития требуется, чтобы у заражающего штамма присутствовала плаزمида *rXO2* и регуляторный ген *atxA*, локализованный на плазмиде *rXO1*, но не гены токсинообразования [9, 50].

Штаммы, лишенные летального токсина, но сохранившие плазмиду *rXO2* и ген *atxA* в целом сохраняют для кроликов вирулентность, сопоставимую с вирулентностью полноценных природных штаммов [42], причем, несмотря на развитие внутренних патологий при сибирской язве у кроликов, внешние проявления болезни бывают практически неразличимыми до гибели животных. Это не искажает данных эксперимента, но доставляет неудобства с точки зрения биоэтики, так как может затруднить своевременную эвтаназию.

Также можно отметить, что кроликов пытались использовать как модель для оценки вирулентности штамма *B. cereus* G9241, выделенного от человека, у которого он вызвал тяжелую легочную инфекцию, схожую с сибирской язвой. Подобные штаммы, обладающие плазмидами, функционально аналогичными плазмидам *rXO1* и *rXO2*, можно объединить в группу *B. cereus* *bv. anthracis*, или *bv. anthracoid*. Они представляют серьезную угрозу для приматов в зоне дождевого леса, которая диктует необходимость разработки адекватной модели оценки эпидемического потенциала таких штаммов. Несмотря на то, что кролики высокочувствительны к *B. anthracis*, к штамму G9241 они оказались абсолютно устойчивыми при подкожном заражении и демонстрировали LD₅₀ на 2 порядка выше, чем для вирулентных штаммов сибиреязвенного микроба при аэрозольном заражении [52]. Подобные штаммы *B. cereus*, несмотря на патогенность для нечеловеческих приматов, слабо вирулентны для людей

и для развития инфекционного процесса требуют наличия иммуносупрессивного состояния человека. Слабая вирулентность для нативных кроликов, возможно, коррелирует с вирулентностью для людей, что лишним раз подчеркивает важность кроличьей модели бациллярных заболеваний человека [9].

Кролики традиционно используются в качестве модели для разработки субъединичных вакцин против сибирской язвы и новых методик вакцинации, хотя из-за высокой чувствительности животных к заражению сибирской язвой и малого времени жизни при летальной инфекции охарактеризовать защитные свойства вакцин на модели кроликов несколько труднее, чем на модели приматов. Но при этом у кроликов прослеживается корреляция между титром антител против РА и протективностью при заражении вирулентными штаммами *B. anthracis*, что дает возможность проводить измерения эффективности вакцинации на основе *in vitro* анализа сывороток вакцинированных животных без непосредственного заражения [9]. Также модель кроликов применяется для разработки противосибиреязвенной терапии с применением как токсин-нейтрализующих антител, так и антибиотикотерапии. Но, как и в случае с морскими свинками, на результаты экспериментов может повлиять повышенная чувствительность кроликов к некоторым терапевтическим препаратам и антибиотикам [50].

Золотистые хомячки

Нам не удалось найти достаточно детального описания возможностей исследований сибирской язвы с использованием биомодели золотистых (сирийских) хомячков. Лишь в нескольких исследованиях хомячки использовались для оценки протективности противосибиреязвенных вакцин. Так, А.Померанцев [53] сообщал о возможности эффективной вакцинации хомячков живым вакцинным штаммом. P.F.Fellows [54] при вакцинации хомячков человеческой вакциной AVA обнаружил, что, несмотря на то, что у всех вакцинированных животных детектировались высокие титры антител, вакцинация не предотвратила гибели при заражении вирулентным штаммом *B. anthracis*. В работе [55] было показано, что вакцинация золотистых хомячков рекомбинантными белками *B. anthracis* приводит к продукции высоких титров специфических антител и к защите от заражения токсигенным инкапсулированным аттенуированным штаммом *B. anthracis* 71/12. Этот штамм является представителем так называемых Pasteur-подобных живых вакцин, которые сохранили обе плазмиды вирулентности, но значительно снизили их копияность, в результате чего не полностью утратили вирулентность. В этой модели – вакцинация рекомбинантными белками с адьювантом Фрейнда и последующее заражение Pasteur-подобным штаммом – золотистые хомячки по протективности и иммуногенности вакцины были сравнимы с морскими свинками.

Заключение

На самом деле, учитывая все вышеизложенное, вопрос стоит не об изучении вирулентности, патогенеза и методов терапии и вакцинопрофилактики сибирской язвы самих по себе, а о них же, но в отношении лишь взаимодействия патогена с определенным хозяином. При этом очевидно, что

наибольший интерес представляют указанные аспекты сибиреязвенной инфекции у людей и одомашненных копытных животных, являющихся основой сельского хозяйства (свиней, коров, лошадей, коз, овец и т.д.). Но абсолютное большинство лабораторий, изучающих сибирскую язву и ее возбудитель, вынуждены ограничиваться в своей работе наиболее распространенными лабораторными модельными животными – мышами, крысами, морскими свинками и кроликами, так как использование копытных и приматов (наиболее близких к человеку животных) ограничено не только соображениями биоэтики, но и экономическими причинами – стоимость самих животных и их содержания в вивариях BSL3-BSL4 (патогенность *B. anthracis* диктует именно такие требования к лабораториям и вивариям) делает использование таких животных неоправданно дорогим для повседневной работы. Таким образом, если, например, для итоговых испытаний вакцинных или терапевтических противосибиреязвенных препаратов можно использовать приматов и сельскохозяйственных животных, то для их разработки и первичных испытаний, равно как для другой рутинной работы, приходится обходиться грызунами и кроликами, т.е. животными, которые в природе не являются основными хозяевами сибиреязвенного микроба. И это приводит к необходимости так выбирать модельный организм, чтобы его реакция в эксперименте могла быть в какой-то мере экстраполирована на реакцию «целевого» крупного млекопитающего, в первую очередь человека. А так как основные виды и даже линии лабораторных животных отличаются по своей реакции на заражение сибирской язвой, зачастую требуется использование на разных этапах экспериментальной работы разных лабораторных животных, в зависимости от того, какой конкретно аспект сибиреязвенной инфекции в данный момент требуется смоделировать.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Collier RJ. Membrane translocation by anthrax toxin. *Mol Aspects Med.* 2009;30(6):413-422. DOI: 10.1016/j.mam.2009.06.003
2. Swick MC, Koehler TM, Driks A. Surviving Between Hosts: Sporulation and Transmission. *Microbiol Spectr.* 2016 Aug;4(4):10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015
3. Park JM, Greten FR, Li ZW, Karin M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science.* 2002 Sep 20;297(5589):2048-51. DOI: 10.1126/science.1073163
4. Sharma S, Bhatnagar R, Gaur D. *Bacillus anthracis* Poly-γ-D-Glutamate Capsule Inhibits Opsonic Phagocytosis by Impeding Complement Activation. *Front Immunol.* 2020 Mar 31;11:462. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00462
5. Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr.* 2019 May;7(3):10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018
6. Dragon DC, Rennie RP. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can Vet J.* 1995 May;36(5):295-301.
7. Gobeli Brawand S, Kittl S, Dettwiler M, Thomann A, Feyer S, Cachim J, et al. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. *BMC Vet Res.* 2019 Jul 29;15(1):265. DOI: 10.1186/s12917-019-1996-4
8. Timofeev V, Bahtejeva I, Mironova R, Titareva G, Lev I, Christiany D, et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. *PLoS One.* 2019 May 22;14(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140
9. Welkos S, Bozue J, Twenhafel N, Cote C. Animal Models for the Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Infection by *Bacillus anthracis*. *Microbiol Spectr.* 2015 Feb;3(1):TBS-0001-2012. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0001-2012
10. Bakhteeva I, Timofeev V. Some Peculiarities of Anthrax Epidemiology in Herbivorous and Carnivorous Animals. *Life (Basel).* 2022 Jun 10;12(6):870. DOI: 10.3390/life12060870
11. Ivins BE, Ezzell JW Jr, Jemski J, Hedlund KW, Ristroph JD, Leppla SH. Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* 1986 May;52(2):454-8. DOI: 10.1128/iai.52.2.454-458.1986
12. Heninger S, Drysdale M, Lovchik J, Hutt J, Lipscomb MF, Koehler TM, et al. Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect Immun.* 2006 Nov;74(11):6067-74. DOI: 10.1128/IAI.00719-06
13. Welkos SL. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pX01-) *Bacillus anthracis*. *Microb Pathog.* 1991 Mar;10(3):183-98. DOI: 10.1016/0882-4010(91)90053-d
14. Welkos SL, Vietri NJ, Gibbs PH. Non-toxigenic derivatives of the Ames strain of *Bacillus anthracis* are fully virulent for mice: role of plasmid pX02 and chromosome in strain-dependent virulence. *Microb Pathog.* 1993 May;14(5):381-8. DOI: 10.1006/mpat.1993.1037
15. Fellows PF, Linscott MK, Ivins BE, Pitt ML, Rossi CA, Gibbs PH, et al. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine.* 2001 Apr 30;19(23-24):3241-7. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00021-4
16. Jo SK, Ahn BE, Choi EH, Kang JE, An H, Oh MD, et al. Evaluation of the protective efficacy of recombinant protective antigen vaccine (GC1109)-immunized human sera using passive immunization in a mouse model. *Vaccine.* 2020 Feb 11;38(7):1586-1588. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.12.048
17. Jauro S, Ndumnego OC, Ellis C, Buys A, Beyer W, Heerden HV. Immunogenicity of Non-Living Anthrax Vaccine Candidates in Cattle and Protective Efficacy of Immune Sera in A/J Mouse Model Compared to the Sterne Live Spore Vaccine. *Pathogens.* 2020 Jul 10;9(7):557. DOI: 10.3390/pathogens9070557
18. Phaswana PH, Ndumnego OC, Koehler SM, Beyer W, Crafford JE, van Heerden H. Use of the mice passive protection test to evaluate the humoral response in goats vaccinated with Sterne 34F2 live spore vaccine. *Vet Res.* 2017 Sep 7;48(1):46. DOI: 10.1186/s13567-017-0451-4
19. Turnbull PC, Tindall BW, Coetzee JD, Conradie CM, Bull RL, Lindeque PM, et al. Vaccine-induced protection against anthrax in cheetah (*Acinonyx jubatus*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Vaccine.* 2004 Sep 3;22(25-26):3340-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.02.037
20. Haley PJ. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology.* 2003 Jun 3;188(1):49-71. DOI: 10.1016/S0300-483X(03)00043-X
21. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004 Mar 1;172(5):2731-8. DOI: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
22. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Mar;294(3):L387-98. DOI: 10.1152/ajplung.00330.2007

23. Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathan S, Humke EW, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 3;105(22):7803-8. DOI: 10.1073/pnas.0802726105
24. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*. 1998 May 1;280(5364):734-7. DOI: 10.1126/science.280.5364.734
25. Moayeri M, Leppla SH. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med*. 2009 Dec;30(6):439-55. DOI: 10.1016/j.mam.2009.07.003
26. Park JM, Greten FR, Li ZW, Karin M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2048-51. DOI: 10.1126/science.1073163
27. Pellizzari R, Guidi-Rontani C, Vitale G, Mock M, Montecucco C. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α . *FEBS Lett*. 1999 Nov 26;462(1-2):199-204. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01502-1
28. Vitale G, Pellizzari R, Recchi C, Napolitani G, Mock M, Montecucco C. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 30;248(3):706-11. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9040
29. Cote CK, Rea KM, Norris SL, van Rooijen N, Welkos SL. The use of a model of *in vivo* macrophage depletion to study the role of macrophages during infection with *Bacillus anthracis* spores. *Microb Pathog*. 2004 Oct;37(4):169-75. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.06.013
30. Cote CK, Van Rooijen N, Welkos SL. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect Immun*. 2006 Jan;74(1):469-80. DOI: 10.1128/IAI.74.1.469-480.2006
31. Anthrax in Humans and Animals. 4th edition. Geneva: World Health Organization; 2008. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310486/>
32. Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, Schuck P, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3902-8. DOI: 10.1128/IAI.00200-09
33. Cui X, Li Y, Moayeri M, Choi GH, Subramanian GM, Li X, et al. Late treatment with a protective antigen-directed monoclonal antibody improves hemodynamic function and survival in a lethal toxin-infused rat model of anthrax sepsis. *J Infect Dis*. 2005 Feb 1;191(3):422-34. DOI: 10.1086/427189
34. Joshi A, Kate S, Poon V, Mondal D, Boggara MB, Saraph A, et al. Structure-based design of a heptavalent anthrax toxin inhibitor. *Biomacromolecules*. 2011 Mar 14;12(3):791-6. DOI: 10.1021/bm101396u
35. Scobie HM, Thomas D, Marlett JM, Destito G, Wigelsworth DJ, Collier RJ, et al. A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J Infect Dis*. 2005 Sep 15;192(6):1047-51. DOI: 10.1086/432731
36. Little SF, Webster WM, Fisher DE. Monoclonal antibodies directed against protective antigen of *Bacillus anthracis* enhance lethal toxin activity in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Jun;62(1):11-22. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00782.x
37. Lincoln RE, Walker JS, Klein F, Rosenwald AJ, Jones WI Jr. Value of field data for extrapolation in anthrax. *Fed Proc*. 1967 Sep;26(5):1558-62.
38. Smith H, Keppie J, Stanley JL, Harris-Smith PW. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. IV. Secondary shock as the major factor in death of guinea-pigs from anthrax. *Br J Exp Pathol*. 1955 Jun;36(3):323-35.
39. Lincoln RE, Rhian MM, Klein F, Fernelius A. Pathogenesis as Related to Physiological State of Anthrax Spore and Cell. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN. 1961.
40. Walker JS, Klein F, Lincoln RE, Fernelius AL. Temperature response in animals infected with *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 1967 Sep;94(3):552-6. DOI: 10.1128/jb.94.3.552-556.1967
41. Levy H, Weiss S, Altboum Z, Schlomovitz J, Rothschild N, Glinert I, et al. The effect of deletion of the edema factor on *Bacillus anthracis* pathogenicity in guinea pigs and rabbits. *Microb Pathog*. 2012 Jan;52(1):55-60. DOI: 10.1016/j.micpath.2011.10.002
42. Levy H, Weiss S, Altboum Z, Schlomovitz J, Glinert I, Sittner A, et al. Differential contribution of *Bacillus anthracis* toxins to pathogenicity in two animal models. *Infect Immun*. 2012 Aug;80(8):2623-31. DOI: 10.1128/IAI.00244-12
43. Levy H, Glinert I, Weiss S, Sittner A, Schlomovitz J, Altboum Z, et al. Toxin-independent virulence of *Bacillus anthracis* in rabbits. *PLoS One*. 2014 Jan 8;9(1):e84947. DOI: 10.1371/journal.pone.0084947
44. Jenkins A, Cote C, Twenhafel N, Merkel T, Bozue J, Welkos S. Role of purine biosynthesis in *Bacillus anthracis* pathogenesis and virulence. *Infect Immun*. 2011 Jan;79(1):153-66. DOI: 10.1128/IAI.00925-10
45. Little SF, Knudson GB. Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infect Immun*. 1986 May;52(2):509-12. DOI: 10.1128/iai.52.2.509-512.1986
46. Turnbull PC, Broster MG, Carman JA, Manchee RJ, Melling J. Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Infect Immun*. 1986 May;52(2):356-63. DOI: 10.1128/iai.52.2.356-363.1986
47. Savransky V, Austin J, Tordoff K, Sanford D, Lemiale L, Park S, et al. Protective efficacy of a novel anthrax vaccine against inhalational anthrax in guinea pigs is associated with induction of robust immune response, abstr Bacillus-ACT: The International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*, Brugge, Belgium, 7 to 11 August 2011. 2011.
48. Bielinska AU, Janczak KW, Landers JJ, Makidon P, Sower LE, Peterson JW, et al. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect Immun*. 2007 Aug;75(8):4020-9. DOI: 10.1128/IAI.00070-07
49. Gu M, Hine PM, James Jackson W, Giri L, Nabors GS. Increased potency of BioThrax anthrax vaccine with the addition of the C-class CpG oligonucleotide adjuvant CPG 10109. *Vaccine*. 2007 Jan 5;25(3):526-34. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.07.056
50. Twenhafel NA. Pathology of inhalational anthrax animal models. *Vet Pathol*. 2010 Sep;47(5):819-30. DOI: 10.1177/0300985810378112
51. Zaucha GM, Pitt LM, Estep J, Ivins BE, Friedlander AM. The pathology of experimental anthrax in rabbits exposed by inhalation and subcutaneous inoculation. *Arch Pathol Lab Med*. 1998 Nov;122(11):982-92.
52. Wilson MK, Vergis JM, Alem F, Palmer JR, Keane-Myers AM, Brahmabhatt TN, et al. *Bacillus cereus* G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice. *Infect Immun*. 2011 Aug;79(8):3012-9. DOI: 10.1128/IAI.00205-11
53. Pomerantsev AP, Staritsin NA, Mockov YuV, Marinin LI. Expression of cereolysine AB genes in *Bacillus anthracis* vaccine strain ensures protection against experimental hemolytic anthrax infection. *Vaccine*. 1997 Dec;15(17-18):1846-50. DOI: 10.1016/S0264-410X(97)00132-1
54. Fellows PF, Linscott MK, Little SF, Gibbs P, Ivins BE. Anthrax vaccine efficacy in golden Syrian hamsters. *Vaccine*. 2002 Jan 31;20(9-10):1421-4. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00461-3
55. Kravchenko T, Titareva G, Bakhteeva I, Kombarova T, Borzilov A, Mironova R, et al. Using a Syrian (Golden) Hamster Biological Model for the Evaluation of Recombinant Anthrax Vaccines. *Life (Basel)*. 2021 Dec 11;11(12):1388. DOI: 10.3390/life11121388

Информация о соавторах:

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

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

Information about co-authors:

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

Galina M. Titareva, PhD, MD, Senior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Irina V. Bakhteeva, PhD, MD, Senior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Tatiana B. Kravchenko, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

ИИ революционизирует предсказание функций белков с помощью «DeepGO-SE»

Ученые разработали «DeepGO-SE» – метод предсказания функций геной онтологии (ГО) по белковым последовательностям с помощью большой, предварительно обученной модели белкового языка.

Хотя предсказание структуры белков с годами становится все более точным, предсказание функций белков остается сложной задачей из-за ограниченного числа известных функций, усугубляемого их взаимодействием и сложностью. Для описания функций белков используются ГО. ГО включает три подонтологии, описывающие молекулярные функции-белков, их роль в биологических процессах и клеточные компоненты, в которых они активны.

Фоновые знания, содержащиеся в аксиомах ГО, могут быть использованы с помощью моделей машинного обучения для улучшения прогнозов

В настоящем исследовании ученые разработали метод предсказания функций белков DeepGO-SE, использующий большую, предварительно обученную модель языка белков. В DeepGO-SE реализовано обучение с расширением знаний за счет семантического соответствия в три этапа.

Затем отдельные белки были представлены вкраплениями эволюционной модели 2 (ESM2) и использованы в качестве экземпляров в приближенной модели для максимизации истинности утверждения в качестве цели оптимизации. Наконец, эта процедура была повторена для создания приближенных моделей.

Исследователи сравнили свой метод с пятью базовыми методами, используя набор данных UniProtKB/Swiss-Prot. Базовыми методами были наивный подход, многослойный перцептрон (MLP), DeepGraphGO, DeepGoZero и DeepGOCNN. Подонтологии ГО обучались и оценивались отдельно. DeepGO-SE значительно превзошел базовые методы.

В целом, DeepGO-SE – это улучшенный метод предсказания функций белков, который включает в себя особенности последовательности, полученные из предварительно обученной модели языка белков, фоновые знания ГО и белок-белковые взаимодействия. Он может предсказывать биологические процессы и клеточные компоненты только на основе последовательности белков, однако для получения наилучших результатов требуется информация о белок-белковых взаимодействиях. Поскольку многие новые белки не имеют известных взаимодействий, необходимы методы, предсказывающие взаимодействия для новых белков только по их последовательности.



*Kulmanov M, Guzmán-Vega FJ, Duek Roggli P, Lane L, Arold ST, Hoehndorf R.
Protein function prediction as approximate semantic entailment.
Nat Mach Intell. Published online February 14, 2024. DOI: 10.1038/s42256-024-00795-w
<https://www.nature.com/articles/s42256-024-00795-w>*

Исследования четвертичных аммониевых соединений в качестве противомикробных агентов

Ю.А.Буковская, Т.Ф.Черных

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

В обзорной статье представлена актуальная информация зарубежных исследований о практическом применении четвертичных аммониевых соединений, используемых в качестве дезинфицирующих средств. Проведен поиск информации в электронной базе данных PubMed за период 2020–2023 гг.

Особый акцент сделан в вопросах механизма действия, противомикробной активности, формирования резистентности, методов обработки, эффективности, а также влияния на образование микробных биопленок.

Ключевые слова: дезинфицирующие средства, действующее вещество, штаммы микроорганизмов, противомикробная активность, биоцидная активность, резистентность, микробная биопленка

Для цитирования: Буковская Ю.А., Черных Т.Ф. Исследования четвертичных аммониевых соединений в качестве противомикробных агентов. Бактериология. 2024; 9(3): 118–124. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-118-124

Studies of quaternary ammonium compounds as antimicrobial agents

Yu.A.Bukovskaya, T.F.Chernykh

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
Saint Petersburg, Russian Federation

The review article provides up-to-date information from foreign studies on the practical use of quaternary ammonium compounds used as disinfectants. The information was searched in the PubMed electronic database for the period 2020–2023 years.

Particular emphasis is placed on the mechanism of action, antimicrobial activity, the formation of resistance, processing methods, efficiency, as well as in the formation of microbial biofilms

Key words: disinfectants, active substance, strains of microorganisms, antimicrobial activity, biocidal activity, resistance, microbial biofilm

For citation: Bukovskaya Yu.A., Chernykh T.F. Studies of quaternary ammonium compounds as antimicrobial agents. Bacteriology. 2024; 9(3): 118–124. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-118-124

Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) являются представителями катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) и широко используются в составе дезинфицирующих средств (ДС) как самостоятельные дезинфицирующие вещества (ДВ), так и в комбинациях с другими ДВ. Представители этой группы дезинфектантов обладают бактерицидной и фунгицидной активностью. Избирательно инактивируют вирусы (неэффективны при инаktivации вирусов без оболочки). Не проявляют спороцидного и туберкулоцидного действия.

ДС на основе ЧАС обладают комплексом преимуществ: нелетучи, неогнеопасны, в рекомендованных концентрациях не оказывают местно-раздражающего, кожно-резорбтивного

и сенсibiliзирующего действия, не вызывают коррозии металлов, многие обладают моющими свойствами, что позволяет объединить очистку и дезинфекцию. По своим характеристикам эти соединения подходят для использования в медицинских, ветеринарных, пищевых, животноводческих организациях и для бытовых нужд.

Первые представители этого класса веществ активно используются с 1940-х гг. (бензалкония хлорид – с 1935 г.) и нашли широкое применение в качестве дезинфектантов, антисептиков, консервантов и ПАВ. Помимо дезинфектологии, благодаря своим физико-химическим свойствам востребованы в промышленности и быту, как красители, смягчители и т.д. [1, 2].

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. Проф. Попова, 14, лит. А
Статья поступила 12.01.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Tatyana F. Chernykh, PhD, DSc (Pharmaceutical Sciences), Professor, Head of the Department of Microbiology, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 14, lit. A Professor Popov str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

The article was received 12.01.2024, accepted for publication 30.09.2024

Цель: анализ данных о практическом применении дезинфектантов на основе ЧАС, затрагивающий вопросы описания, классификации, преимуществ и недостатков в сравнении с другими дезинфицирующими веществами, путем проведения систематического обзора публикаций соответствующих оригинальных исследований.

Материалы и методы

Проведен поиск информации в электронной базе данных PubMed по языку и дате публикации.

В работу включались все описательно-оценочные исследования, опубликованные в период с января 2020 г. по август 2023 г. и содержащие информацию следующего типа:

- 1) вопросы, связанные с изучением механизмов дезинфицирующего действия ЧАС;
- 2) определение противомикробной активности ДС, содержащих ЧАС в качестве ДВ;
- 3) определение противомикробной эффективности;
- 4) антимикробная резистентность, включая вопросы генотипического и фенотипического ее формирования, определения устойчивых к ДС штаммов микроорганизмов и их экологических ниш, определения активности ДС в отношении резистентных штаммов микроорганизмов;
- 5) сравнение режимов, протоколов, методик обработки ДС;
- 6) систематические обзоры публикаций более ранних временных периодов.

Из обзора были исключены публикации, освещающие использование ЧАС не в качестве ДВ (например, в качестве новых лекарственных препаратов в онкологии, стоматологии); повторные публикации, содержащие сходные данные.

При выполнении поиска использовались следующие термины в базе данных PubMed: (“quaternary ammonium compound”) AND (disinfect*). Такой запрос позволил на основе семантического анализа текста публикаций максимально исключить статьи, не соответствующие целям исследования.

Результаты исследования и их обсуждение

Временные рамки публикаций, отобранных по терминам, ограничены 1951–2023 гг. По результатам поискового запроса обнаружены 304 публикации, из которых 293 соответствовали критериям включения. За период 01.01.2020–25.08.2023 было отобрано 67 публикаций.

Российскими химиками-исследователями на основе литературного обзора установлена связь между структурой ЧАС и биоцидной активностью. Так, ЧАС с несколькими атомами азота (бис-, мульти-, поли-) в сравнении с моно-катионными соединениями обладают большим эффектом в отношении грамположительных и, тем более, грамотрицательных бактерий. При этом добавление второго заряженного азота без алкильной цепи не всегда повышает активность, тогда как добавление второй и третьей алкильных цепей увеличивает токсичность. Эфирные и амидные группы между азотом и алкильной группой уменьшают эффективность и токсичность соединений [3].

Изучению механизмов антимикробного действия посвящено не так много работ. В исследованиях канадских ученых разработан быстрый флуоресцентный мембранный анализ

на основе красителя йодида пропидия с целью различать восприимчивость к ЧАС – бензалконию и цетримиду – среди грамотрицательных видов *Enterobacterales* и *Pseudomonadales*. Поскольку липиды клеточной оболочки являются мишенью этих ДВ, то различия в строении липидной оболочки влияют на проникновение красителя [4].

Подобный метод применен в других исследованиях (Германия, Австралия), посвященных изучению борьбы с резистентностью. Исследователи описывают синтез флуоресцентного N-додецил-N,N-диметил-[2-[(4-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-7-ил)амино]этил]-йодида азания, декларируют противомикробную активность, сравнимую с часто используемыми хлоридом бензалкония и хлоридом бензил-диметил-додециламмония. Опыты проводили на диких и резистентных штаммах *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Экспериментальные исследования ЧАС методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии подтверждают локализацию ДВ в клеточной оболочке и позволяют сделать выводы о резистентности бактерий (*E. coli*) к ЧАС, обусловленной снижением внутриклеточного накопления у мутанта с пониженным поверхностным зарядом, неоднородностью накопления в пределах изогенных популяций *E. coli* и увеличением оттока ЧАС, что влияет на накопление в клеточной оболочке и цитоплазме [5, 6].

Ученые из Новой Зеландии изучали *in vitro* активность хлорида 3-(триметоксисилил)-пропилдиметилдодецила-аммония (CAS 27668–52-6; C₂₆H₅₈ClNO₃Si), кремнийорганического ЧАС. Игольчатая структура алкильной гидрофобной цепи С18 проникает в клеточную оболочку, что вызывает денатурацию в ней и нарушение электролитного и осмотического баланса в клетке и последующий ее лизис. ЧАС распыляли на влажные и сухие поверхности стеклянных и полиэтиленовых носителей. ДС показало эффективность к грамположительным бактериям (*S. aureus*), меньшую к грамотрицательным (*E. coli*), не влияло на спорообразующие (*Bacillus cereus*). Также, определяя минимальную подавляющую концентрацию (МПК) в суспензионных культурах, авторы открывают путь к обсуждению механизма деполаризации мембраны и генерации внутриклеточных активных форм кислорода [7].

Изучению механизмов взаимодействия микробной клетки с ДС и формирования устойчивости посвящена публикация в 2022 г. в *Microbial Drug Resistance*. Изучая антимикробную резистентность микроорганизмов, способных к росту в среде, содержащей ЧАС в качестве единственного источника углерода, исследователи описывают альтернативные метаболические пути, в т.ч. гидроксилирование, N-деалкилирование, N-деметилирование и β-окисление ЧАС. Это открывает перспективы как выбора более рациональной тактики использования ДС, так и экологически безопасного разложения ЧАС в окружающей среде, что немаловажно при утилизации ДС [8].

Обсуждению вопроса резистентности микроорганизмов к ЧАС посвящены и другие публикации. Китайские ученые исследовали гены устойчивости *Pseudoxanthomonas mexicana* и грибов рода *Candida* к хлориду гексадецилтриметиламмония (ген резистентности к ЧАС, именуемый *QRG*) [9].

C.J.Slipski, T.R.Jamieson-Datzkiw в Канаде провели исследование протеобактериальных плазмидных интегронов, кодирующих эффлюксный насос (помпу) оттока ЧАС. Работа была посвящена правильному аннотированию и коррекции

баз данных секвенирования генов устойчивости к ЧАС. В качестве исследуемой культуры применяли *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью. Важный вывод исследования посвящен эффлюксному насосу оттока в биопленках и в планктонных культурах [10].

Клонирование и сверхэкспрессия энтеробактериальной последовательности *Gdx*, передаваемой на плаزمиде, показали, что эти гены придают более высокую устойчивость к ДС, содержащим ЧАС. Это вызвало озабоченность в профилактике безопасности пищевых продуктов [11].

Были изучены 197 штаммов *Listeria monocytogenes*, отобранных из пищевой, животной и окружающей среды. Установлено, что насос оттока *emrC*, плазмидно-кодируемая каскада *bcrABC* (Elhanafi et al., 2010) и транспозон *Tn6188* (Müller et al., 2013) связаны с устойчивостью к хлориду бензалкония. Эти гены передаются плазмидами и чаще встречались в штаммах, выделенных на объектах пищевой промышленности, но не от человека [12].

Исследователи из Уганды с использованием методов мультиплексной полимеразной цепной реакции и секвенирования по Сэнгеру описывают связанные с резистентностью к разным ДС гены (*qacA/B* и *qacC*), обнаруженные у *S. aureus*. Изоляты ($n = 125$) были отобраны на различных инструментах парикмахерских салонов. Чаще встречались культуры микроорганизмов *Staphylococcus epidermidis* (28,1%), *S. aureus* (26,5%). Наибольшая резистентность выявлена к 1%-му раствору гипохлорита натрия (NaClO). Из 8 устойчивых к ДС *S. aureus*, проанализированных на наличие генов *qac*, 2 изолята оказались положительными по гену *qacA/B*, еще 2 изолята оказались положительными по гену *qacC*. На основании этих данных рекомендуется поиск генов *qac* для устойчивости к ДС у других видов бактерий [13].

В 40 изолятах *S. aureus*, выделенных у новорожденных в палатах интенсивной терапии (Корея, 2017–2018 гг.), определены гены устойчивости к хлоргексидину (*qacA/B*), ЧАС (*smr*), мупироцину (мутация *iles*, *mupA*, *mupB*). В 70% изолятов присутствовал метициллин-резистентный *S. aureus* (MRSA) [14].

180 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в окружающей среде лечебного учреждения и человека во Франции с 2011 по 2020 г., подверглись определению чувствительности к 7 классам антибиотиков и ЧАС (хлориду дидецилдиметиламмония). Снижение восприимчивости к ЧАС наблюдалось у 28,0% штаммов. Механизм, предположительно, связан с сверхэкспрессией гена эффлюксного насоса *MexAB-OprM* (хромосомная резистентность). Среди изученных штаммов 11,9% были с множественной лекарственной устойчивостью и 0,7% – с широкой лекарственной устойчивостью [15].

Целью исследований германских ученых было изучение влияния консервантов на формирование устойчивости к противомикробным препаратам. В качестве тест-микроорганизмов использовали *Acinetobacter baylyi*, *B. subtilis* и *E. coli*. Выявлено, что ДС (хлоргексидина биглюконат, дидецилдиметиламмония хлорид, металлическая медь, пиретроид, инсектицид перметрин и фунгицид пропиконазол) умеренно увеличивают частоту мутаций у *E. coli* (в 2–4 раза). Хлорид бензалкония, хлоргексидин и перметрин умеренно увеличивают (в 4 раза) конъюгацию [16].

В Швейцарии проводили исследования мутации гена *ΔcspABD*, который показал повышение чувствительности к

низину, катионным противомикробным препаратам, а также к ЧАС – хлориду бензалкония [1].

Определение МПК хлоргексидина биглюконата и генов резистентности *qacA/B*, *smr* и *qacJ*, *qacG* на клинические изоляты метициллин-чувствительного *Staphylococcus pseudintermedius* (MSSP, $n = 20$) и метициллин-резистентного *S. pseudintermedius* (MRSP, $n = 50$), выделенных от собак, показало несоответствие результатов МПК, заявленных во вкладышах (инструкции): они были на порядок ниже [17].

В исследованиях *in vitro* по вопросу перекрестной устойчивости микроорганизмов к химиотерапевтическим (ципрофлоксацин) и дезинфицирующим средствам (бензалкония хлорид) авторы указывают на более низкий бактерицидный эффект на изоляты *E. coli* [18].

Ряд публикаций американских ученых посвящен воздействию ЧАС на биогеосферу и влиянию на организм человека, включая патологические изменения. На примере соединений ЧАС были выявлены пределы профессионального воздействия и конкретные подходы их определения. Полученные данные могут быть использованы для оценки гигиены труда [19].

В журнале «Хемосфера» (2022 г.) опубликована статья о разработке протокола исследования почвы и микробиоты. При этом авторы отмечают значительные концентрации новых загрязнителей – фармацевтических препаратов и мощных веществ, включая ЧАС с алкильной цепью C12-C18 [20].

В ряде публикаций описана противомикробная эффективность ДС, в т.ч. содержащих ЧАС. В Малайзии 5%-е и 10%-е растворы алкилдиметилбензиламмония хлорида подверглись исследованию на эффективность против аэробных мезофильных бактерий, дрожжей и плесени на поверхности яичной скорлупы при определенной микробной нагрузке. Обработка эффективна и безопасна для пищевых продуктов [21].

В Кении исследователи показали существование резистентности к антибиотикам среди бактериальных изолятов из рыб. При этом изоляты чувствительны к большинству ДВ, в т.ч. к ЧАС. ЧАС уступают по эффективности перекиси водорода, формалину и соединениям йода [22].

В одном исследовании (метод – секвенирование и анализ ампликона гена *16S* рРНК) было показано, что помещения (палаты пациентов), обработанные ДС на основе отбеливателя, содержат больше грамположительных микроорганизмов, а обработанные ДС на основе ЧАС – грамтрицательных. Perry-Dow K.A., de Man T.J.B., Halpin A.L. и другие авторы делают выводы, что характер используемого ДС может влиять на микробиом [23].

Интересная публикация M.Islam et al, где доказано, что доноры оксида азота (NO) предотвращают образование биопленки или диспергируют ее, особенно в сочетании с ДС, содержащими ЧАС [24].

Подавляющее большинство публикаций посвящено изучению и анализу (в случаях обзора) направленной противомикробной активности ЧАС. Наиболее пристальное внимание уделено активности ДВ против SARS-CoV-2 либо суррогатов этого вируса – оболочечных вирусов.

Также внимание многих исследователей обращено на проблему инактивации штаммов микроорганизмов, обладающих резистентностью к антибиотикам.

В обзорной американской статье (май 2020 г.) исследователи ставят под сомнение заявление Центров по контролю и

профилактике заболеваний (CDC) об эффективности против SARS-CoV-2 спиртов и ЧАС. В публикации авторы приводят эффективность ДВ против вирусов гриппа, грамположительных и грамотрицательных бактерий. Доказано, что ДВ эффективны в снижении вирусной нагрузки COVID-19, т.к. микроорганизмы содержат относительно схожие фосфолипидные мембраны. Приводятся данные о перспективности новых мультикационных ЧАС, что требует дальнейших исследований [25].

В обзор назальных дезинфектантов против SARS-CoV-2 с 2010 по 2020 г. были включены ЧАС. Они активны в отношении и других коронавирусов. Предположительным механизмом действия считается повышение эндоцитарного и лизосомального pH [26].

Канадскими исследователями (2022 г.) проанализирована эффективность 21 ДС при инактивации бактериофага MS2 (хозяин – *E. coli*), который моделирует кишечные вирусы человека, такие как NoV и HAV, испытанием на поверхности из пластика и нержавеющей стали. Препараты содержали в качестве ДВ спирт, хлорид бензалкония, перекись водорода (H_2O_2), соляную кислоту или NaClO. Для дезинфекции поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, предложены ДС, содержащие этанол и NaClO [27].

В журнале «Пищевая микробиология» опубликованы исследования активности ДС на основе лимонной кислоты и ЧАС к 14 изолятам *L. monocytogenes* при 4–30°C. Эффективность ДС доказана в опытах жидких культурах при 4–23°C, на обрабатываемых поверхностях препараты не оказывали должного воздействия [28].

На рынке в Коста-Рике оценивалась распространенность *L. monocytogenes* в мясных продуктах, факторы загрязненности и чувствительность к ДС на основе кислорода и ЧАС. Была продемонстрирована большая активность кислорода, также были эффективны ЧАС, но при более высоких концентрациях. При этом исследователи высказывают мнение, что наличие генов *qacH* и *bcrABC* в связке с субрабочей концентрацией приводит к формированию резистентных штаммов [29].

Для оценки обеззараживания патогенами поверхностей (тефлоновые носители) были взяты модельные штаммы *S. aureus* и *Acinetobacter baumannii*. Для обработки использовали салфетки, пропитанные 0,26%-м ЧАС (продукт А) и 0,025%-й раствор гипохлорита натрия при нейтральном pH, первый оказался более эффективен, чем второй [30].

Cutts T.A., Kasloff S.B. и другие исследователи оценивали эффективность четырех ДС в салфетках, пропитанных активированной перекисью водорода, этанолом, гипохлоритом натрия (NaOCl) и ДС на основе ЧАС против вируса Эбола, варианта Макона (EBOV), вируса везикулярного стоматита (VSV) серотипа Индианы. Все образцы ДС были эффективны [31].

Исследовали влияние ряда факторов, включая ЧАС, на эффективность дезинфицирующих средств для рук на спиртовой основе (этиловый или изопропиловый спирты), повторенные через 3 месяца. Было показано, что как время воздействия, так и тип дезинфицирующего средства влияли на активность против *S. aureus*, тогда как для *E. coli* время воздействия было значимым, в то время как тип дезинфицирующего средства был менее значимым. Включение в состав

дезсредства ЧАС по-разному влияло на 3-месячную активность образцов. Исследователи пришли к выводу, что составы должны быть наилучшим образом адаптированы для конкретных целей, а универсального дезинфицирующего средства для рук может не существовать. [32].

Yim J.H., Song K.Y. и Kim H. оценили эффективность гипохлорита натрия, гипохлорита кальция и ЧАС в ингибировании вегетативных клеток и спор *Bacillus anthracis* – возбудителя сибирской язвы, которая часто в ветеринарии вызывает смерть животных. Гипохлорит кальция и ЧАС показали лучшую эффективность, чем гипохлорит натрия, в полном уничтожении вегетативных клеток. ДС на основе ЧАС был неэффективен против спор суррогата *B. anthracis* [33].

В Португалии проводили изучение эффективности и долговечности коммерческого поверхностного покрытия на основе ЧАС (<0,5% диметилпентадециламмония хлорид; <0,3% дидецилдиметиламмония хлорид; <0,2% другие ЧАС; вспомогательные вещества и растворители). ДС наносили на поверхность стекла, поливинилхлорида и нержавеющей стали. Антимикробное покрытие было эффективно против тест-организмов (*E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ESB260 и *L. monocytogenes* Scott A) уже менее чем за одну минуту, но не более одной недели. При оценке влияния миграции ЧАС в пищу обнаруженные следовые количества ($\leq 0,2$ мг/кг) не продемонстрировали цитотоксичности для клеток колоректальной аденокарциномы человека [34].

Органосилановые ЧАС исследовались в качестве антимикробных покрытий, которые после истирания в течение 2 ч сохраняли свою активность.

Результаты демонстрируют, что некоторые ЧАС обладают вирулицидной активностью в отношении оболочечных вирусов, но не в соответствии с требуемыми условиями. Объектом исследования являлся бактериофаг ф6 (*Pseudomonas syringae*) [35].

Установлено, что препарат на основе ЧАС (C8-C18) был неэффективен в отношении штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных у пациентов с коклюшем в Чехии в 2014 и 2015 гг., а два препарата на основе этанола и пропанола оказались более эффективными [2].

Бактерии *Acinetobacter* spp., которые часто являются пищевыми патогенами, подверглись воздействию ДС на основе гипохлорита натрия, ЧАС и бигуанида и ДС с надуксусной кислотой. Доказано, что в рекомендуемых дозировках работает только комбинированный препарат [36].

В Японии в исследованиях *in vitro* при разработке модели птичников, зараженных сальмонеллой путем осаждения пыли на керамические носители и носители из нержавеющей стали, выявили, что микроорганизмы образовывали сообщества – биопленки. А после очистки ПАВ (при 65°C) дезинфекция проводилась ЧАС или хлорноватистой кислотой (при 25°C). Наиболее эффективным оказался режим замачивания в поверхностно-активном веществе при 65 °C с последующим ополаскиванием водой при 80 °C, дополнительной очисткой с использованием диоксида хлора или дезинфекцией доломитовой известью [37].

В Сербии проводили сравнение эффективности двух ДС, разрешенных к применению в пищевой промышленности: на основе перуксусной кислоты и хлорида бензалкония в суспензии и биопленке культуры *E. coli*, *S. aureus*. В биопленке

(активнее образует *E. coli*) для разрушения вегетативных клеток требуется 5-минутная экспозиция и самая высокая концентрация – до 5% [38].

Исследование *in vitro* проводилось для определения препарата и его действующей дозы – ЧАС, пероксида водорода, кислоты, спирта, хлора и отбеливателя, препятствующих конидиальному прорастанию *Calonectria pseudonaviculata* и *Pseudonectria foliicola*, возбудителей фитофтороза самшита и волютеллы. Обработка ДС (смесь октилдецилдиметил + диоктилдиметил + дидецилдиметил + диметилбензил хлорид аммония, смесь 2-пропанол + дидецилдиметиламмоний хлорид и смесь диметилбензиламмоний хлорид + диметилэтилбензиламмоний хлорид) была наиболее эффективна в снижении переноса от растения к растению фитофтороза самшита и волютеллы при обрезке загрязненными ножницами [39].

За период с 2008 по 2018 г. проводился систематический поиск в базах данных CINAHL и MEDLINE эффективных методов защиты среды медицинских организаций от *Clostridioides difficile*, в т.ч. в одном исследовании была доказана значительная эффективность отбеливателя в сравнении с применением ЧАС [40].

Часть рассматриваемых нами публикаций посвящена определению эффективности протоколов, методик дезинфекции с применением ЧАС.

В исследованиях оценивались режимы уборки поверхностей в ветеринарном дерматологическом кабинете с применением ЧАС. Объект исследования – коагулазоположительные стафилококки. В публикациях даны рекомендации по составлению подробных протоколов уборки и дезинфекции. Соответствующая дезинфекция отдельных объектов требует тщательной проработки [41].

При исследовании в животноводческом центре эффективности мытья полов ДС (ЧАС и перекись водорода) швабрами из хлопка или микрофибры, было доказано предпочтение хлопчатобумажным насадкам. Использование швабры в случае применения ЧАС увеличивает загрязнение, в то время как ДС с перекисью водорода эффективно в течение трехкратного использования швабры. Материал швабры не влиял на эффективность очистки или дезинфекции [42].

Одно из исследований посвящено свойствам протирачных салфеток, пропитанных жидким составом, содержащим хлорид дидецилдиметиламмония, в отношении биопленок *S. aureus* и *A. baumannii* на сухой поверхности. Вискоза уступала полипропиленовым составам [43].

Изучалась антимикробная эффективность (Китай) алкилдиметил-бензиламмония хлорида, нанесенного на протирачные материалы, изготовленные из 100% полиэстера (ПЭТ), 55% целлюлозы / 45% ПЭТ (смесь) и 100% целлюлозы, обработанные плазмой диэлектрического барьерного разряда при атмосферном давлении. Подобная обработка увеличивала активность в отношении грамотрицательных бактерий. При этом, несмотря на гидрофобность волокон, доказана наибольшая антимикробная активность у протирачного материала из 100% полиэстера [44].

В исследованиях американских ученых декларируется, что салфетки, содержащие ЧАС и спирты, рекомендуются для дезинфекции поверхностей в операционных помещениях [45].

В противоположность этому в обзорном европейском исследовании авторы заключили, что «политики» профилактики не требуют одноразовых салфеток для очистки и дезинфекции, при этом «наибольшим воздействием на окружающую среду был изопропиловый спирт», а наиболее целесообразным – салфетки из микрофибры, обработанные ЧАС. Наименее экологически устойчивым вариантом был хлопок с изопропиловым спиртом [46].

Нами по выбранным критериям было отобрано ограниченное количество публикаций, характеризующихся значительной гетерогенностью. Можно отметить тенденцию к увеличению числа работ, связанных с применением ЧАС в качестве дезинфектантов.

Наша выборка включает временные рамки пандемии COVID-19 (Всемирной организацией здравоохранения была объявлена чрезвычайная ситуация в период 11.03.2020–05.05.2023), с этим связано большое количество исследований вирулицидной активности ДС, содержащих ЧАС, в отношении SARS-CoV-2 и его суррогатов (других оболочечных вирусов). В целом при соблюдении протокола обработки (концентрации, времени экспозиции и др.) применение содержащих ЧАС ДС, как однокомпонентных, так и в комбинации, против SARS-CoV-2 на настоящий момент является оправданным.

Большое количество публикаций посвящено изучению противомикробной активности ДС на основе ЧАС, как правило в сравнении с другими ДВ, или в смеси с другими ДВ. Предметом изучения были вирулицидная, бактерицидная, фунгицидная активности ДС в медицинской практике, ветеринарии, животноводстве, пищевой промышленности и на предприятиях питания, в быту, как в реальных условиях, так и в моделях.

По одному исследованию приходится на растениеводство и коммунально-бытовую сферу.

Тест-организмы включают штаммы: музейные, выделенные из окружающей среды, нозокомиальные инфекции, включая антибиотикорезистентные ESCAPE-патогены (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacteriaceae*).

В целом можно сформулировать вывод об активности ЧАС в отношении грамположительных бактерий, в меньшей степени – в отношении грамотрицательных. ЧАС также обладают избирательной вирулицидной активностью. Фунгицидная активность против *Candida* не подтверждена. Важным фактором является эффективность в отношении антибиотикорезистентных штаммов. При этом органическая нагрузка может снижать биоцидную активность ЧАС, а для инактивации микроорганизмов в биопленке, возможно, потребуется большее время экспозиции.

В настоящее время значительное внимание уделяется изучению генетических механизмов формирования устойчивости микроорганизмов к ЧАС и структурно сходным соединениям (например, бигуанидинам). Можно отметить, что гены устойчивости передаются горизонтально (плазмидами) и вертикально. В большинстве случаев формирование устойчивости связано с работой эффлюксных насосов оттока ДС из микробной клетки. При этом авторы, как правило, формулируют выводы о циркуляции в окружающей среде штаммов микроорганизмов, несущих гены устойчивости, при этом

больше всего – в больничных организациях, на производствах медицинских иммунобиологических препаратов и пищевых производствах.

Возможно, такого же пристального внимания заслуживают вопросы безопасности широкого применения ЧАС. Подтверждается накопление соединений в биосфере, включая обнаружение метаболитов в организме человека. Ряд исследований подтверждают токсическое (включая аллергическое) воздействие на живые организмы, особенно при частом контакте, даже в случае соблюдения рекомендуемых рабочих концентраций ДС.

Наличие ряда исследований, изучающих биоцидную активность в зависимости от протокола обработки или формы препарата (свойства протирочного материала и др.), в целом свидетельствует о том, что представители ЧАС достаточно удобны, стабильны, сохраняют длительное время противомикробный эффект.

Мы считаем, что время биоцидной активности покрытий ЧАС, рекомендуемое производителями ДС, требует дополнительной проработки.

Заключение

Таким образом, обзор научных данных за период 01.01. 2020–01.09.2023 об использовании ЧАС в качестве ДС свидетельствует о значительном интересе к проблеме. Исследования обусловлены широкой перспективой использования данного класса соединений, в т.ч. и синтеза новых представителей с заданными свойствами. У ученых вызывает озабоченность возможность негативных воздействий ДС на экосферу, включая формирование резистентных форм микроорганизмов. На сегодняшний день мы уверены, что необходимы дальнейшие исследования в этой области, тщательный подход к разработке, а также апробации методик дезинфекции препаратами на основе ЧАС с дальнейшим неукоснительным соблюдением всех мероприятий на практике.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Muchaamba F, Wambui J, Stephan R, Tasara T. Cold Shock Proteins Promote Nisin Tolerance in *Listeria monocytogenes* Through Modulation of Cell Envelope Modification Responses. *Front Microbiol.* 2021 Dec 24;12:811939. DOI: 10.3389/fmicb.2021.811939
- Dexter Hand disinfectants and their activity against clinical isolates of *Bordetella pertussis*. *Cent Eur J Public Health.* 2022 Dec;30(4):230-234. DOI: 10.21101/cejph.a7141
- Vereshchagin AN, Frolov NA, Egorova KS, Seitkalieva MM, Ananikov VP. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 24;22(13):6793. DOI: 10.3390/ijms22136793
- Gregorichuk BSJ, Reimer SL, Beniac DR, Hiebert SL, Booth TF, Wuzinski M, et al. Antiseptic quaternary ammonium compound tolerance by gram-negative bacteria can be rapidly detected using an impermeant fluorescent dye-based assay. *Sci Rep.* 2020 Nov 25;10(1):20543. DOI: 10.1038/s41598-020-77446-8
- Liu Y, Feng J, Pan H, Zhang X, Zhang Y. Genetically engineered bacterium: Principles, practices, and prospects. *Front Microbiol.* 2022 Oct 13;13:997587. DOI: 10.3389/fmicb.2022.997587
- Nordholt N, O'Hara K, Resch-Genger U, Blaskovich MAT, Rühle B, Schreiber F. A fluorescently labelled quaternary ammonium compound (NBD-DDA) to study resistance mechanisms in bacteria. *Front Microbiol.* 2022 Nov 24;13:1023326. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1023326
- Wiles S, Swift S. The antibacterial potency and antibacterial mechanism of a commercially available surface-anchoring quaternary ammonium salt (SAQAS)-based biocide in vitro. *J Appl Microbiol.* 2022 Oct;133(4):2583-2598. DOI: 10.1111/jam.15729
- Belter B, McCarlie SJ, Boucher-van Jaarsveld CE, Bragg RR. Investigation into the Metabolism of Quaternary Ammonium Compound Disinfectants by Bacteria. *Microb Drug Resist.* 2022 Aug;28(8):841-848. DOI: 10.1089/mdr.2022.0039
- Li D, Gao J, Dai H, Wang Z, Cui Y, Zhao Y, et al. Fates of quaternary ammonium compound resistance genes and the corresponding resistant strain in partial nitrification/anammox system under pressure of hexadecyl trimethyl ammonium chloride. *Water Res.* 2022 Jun 15;217:118395. DOI: 10.1016/j.watres.2022.118395
- Slipki CJ, Jamieson-Datzkiw TR, Zhanel GG, Bay DC. Characterization of Proteobacterial Plasmid Integron-Encoded qac Efflux Pump Sequence Diversity and Quaternary Ammonium Compound Antiseptic Selection in *Escherichia coli* Grown Planktonically and as Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Sep 17;65(10):e0106921. DOI: 10.1128/AAC.01069-21
- Slipki CJ, Jamieson TR, Zhanel GG, Bay DC. Riboswitch-Associated Guanidinium-Selective Efflux Pumps Frequently Transmitted on Proteobacterial Plasmids Increase *Escherichia coli* Biofilm Tolerance to Disinfectants. *J Bacteriol.* 2020 Nov 4;202(23):e00104-20. DOI: 10.1128/JB.00104-20
- Palma F, Radomski N, Guérin A, Sévellec Y, Félix B, Bridier A, et al. Genomic elements located in the accessory repertoire drive the adaptation to biocides in *Listeria monocytogenes* strains from different ecological niches. *Food Microbiol.* 2022 Sep;106:103757. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103757
- Gahongayire S, Almustapha Aliero A, Drago Kato C, Namatovu A. Prevalence and Detection of qac Genes from Disinfectant-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Salon Tools in Ishaka Town, Bushenyi District of Uganda. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2020 Aug 12;2020:1470915. DOI: 10.1155/2020/1470915
- Kang HM, Park KC, Park J, Park SH, Lee DG, Kim JH. Mupirocin and Chlorhexidine Genotypic Resistance Found in *Staphylococcus aureus* Isolated From Young Infants Below 90 Days Old: A Genetic Basis for Eradication Failure. *Pediatr Infect Dis J.* 2021 Jan;40(1):49-54. DOI: 10.1097/INF.0000000000002882
- Pottier M, Gravey F, Castagnet S, Auzou M, Langlois B, Guérin F, et al. A 10-year microbiological study of *Pseudomonas aeruginosa* strains revealed the circulation of populations resistant to both carbapenems and quaternary ammonium compounds. *Sci Rep.* 2023 Feb 14;13(1):2639. DOI: 10.1038/s41598-023-29590-0
- Schmidt SBI, Rodríguez-Rojas A, Roff J, Schreiber F. Biocides used as material preservatives modify rates of de novo mutation and horizontal gene transfer in bacteria. *J Hazard Mater.* 2022 Sep 5;437:129280. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129280
- Walker MA, Singh A, Gibson TW, Rousseau J, Weese JS. Presence of Qac genes in clinical isolates of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* and their impact on chlorhexidine digluconate susceptibility. *Vet Surg.* 2020 Jul;49(5):971-976. DOI: 10.1111/vsu.13413
- Maertens H, Demeyere K, De Reu K, Dewulf J, Vanhauteghem D, Van Coillie E, et al. Effect of subinhibitory exposure to quaternary ammonium compounds on the

- ciprofloxacin susceptibility of *Escherichia coli* strains in animal husbandry. BMC Microbiol. 2020 Jun 11;20(1):155. DOI: 10.1186/s12866-020-01818-3
19. Dotson GS, Lotter JT, Zisook RE, Gaffney SH, Maier A, Colvin J. Setting occupational exposure limits for antimicrobial agents: A case study based on a quaternary ammonium compound-based disinfectant. Toxicol Ind Health. 2020 Sep;36(9):619-633. DOI: 10.1177/0748233720970438
20. Godfrey AR, Dunscombe J, Gravell A, Hunter A, Barrow MP, van Keulen G, et al. Use of QuEChERS as a manual and automated high-throughput protocol for investigating environmental matrices. Chemosphere. 2022 Dec;308(Pt 2):136313. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.136313
21. Chan HY, Meor Hussin AS, Ahmad NH, Rukayadi Y, Farouk AE. Effectiveness of Quaternary Ammonium in Reducing Microbial Load on Eggs. Molecules. 2021 Aug 30;26(17):5259. DOI: 10.3390/molecules26175259
22. Wanja DW, Mbuthia PG, Waruiru RM, Bebora LC, Ngowi HA, Nyaga PN. Antibiotic and Disinfectant Susceptibility Patterns of Bacteria Isolated from Farmed Fish in Kirinyaga County, Kenya. Int J Microbiol. 2020 Jul 30;2020:8897338. DOI: 10.1155/2020/8897338
23. Perry-Dow KA, de Man TJB, Halpin AL, Shams AM, Rose LJ, Noble-Wang JA. The effect of disinfectants on the microbial community on environmental healthcare surfaces using next generation sequencing. Am J Infect Control. 2022 Jan;50(1):54-60. DOI: 10.1016/j.ajic.2021.08.027
24. Islam M, Durie I, Ramadan R, Purchase D, Marvasi M. Exploitation of nitric oxide donors to control bacterial adhesion on ready-to-eat vegetables and dispersal of pathogenic biofilm from polypropylene. J Sci Food Agric. 2020 May;100(7):3078-3086. DOI: 10.1002/jsfa.10340
25. Schrank CL, Minbiole KPC, Wuest WM. Are Quaternary Ammonium Compounds, the Workhorse Disinfectants, Effective against Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2? ACS Infect Dis. 2020 Jul 10;6(7):1553-1557. DOI: 10.1021/acscinfed.0c00265
26. Cegolon L, Javanbakht M, Mastrangelo G. Nasal disinfection for the prevention and control of COVID-19: A scoping review on potential chemo-preventive agents. Int J Hyg Environ Health. 2020 Sep;230:113605. DOI: 10.1016/j.ijheh.2020.113605
27. Chen L, Lee WJ, Ma Y, Jang SS, Fong K, Wang S. The efficacy of different sanitizers against MS2 bacteriophage introduced onto plastic or stainless steel surfaces. Curr Res Food Sci. 2022 Jan 10;5:175-181. DOI: 10.1016/j.crf.2022.01.004
28. Boucher C, Waite-Cusic J, Stone D, Kovacevic J. Relative performance of commercial citric acid and quaternary ammonium sanitizers against *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to food industry. Food Microbiol. 2021 Aug;97:103752. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103752
29. Calvo-Arrieta K, Matamoros-Montoya K, Arias-Echandi ML, Huete-Soto A, Redondo-Solano M. Presence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products Sold at Retail Stores in Costa Rica and Analysis of Contributing Factors. J Food Prot. 2021 Oct 1;84(10):1729-1740. DOI: 10.4315/JFP-21-020
30. Zargar B, Sattar SA. Decontamination of high-touch environmental surfaces (HITES) by wiping: quantitative assessment of a carrier platform simulating pathogen removal, inactivation and transfer in the field. Lett Appl Microbiol. 2023 Feb 16;76(2):ovac073. DOI: 10.1093/lambio/ovac073
31. Cutts TA, Kasloff SB, Krishnan J, Nims RW, Theriault SS, Rubino JR, et al. Comparison of the Efficacy of Disinfectant Pre-impregnated Wipes for Decontaminating Stainless Steel Carriers Experimentally Inoculated With Ebola Virus and Vesicular Stomatitis Virus. Front Public Health. 2021 Aug 10;9:657443. DOI: 10.3389/fpubh.2021.657443
32. Nzekwe IT, Agwuika OI, Okezie MU, Fasheun DO, Nnamani PO, Agubata CO. Designing an ideal alcohol-based hand sanitizer: *in vitro* antibacterial responses of ethanol and isopropyl alcohol solutions to changing composition. AAPS Open. 2021;7(1):5. DOI: 10.1186/s41120-021-00038-x
33. Yim JH, Song KY, Kim H, Bae D, Chon JW, Seo KH. Effectiveness of calcium hypochlorite, quaternary ammonium compounds, and sodium hypochlorite in eliminating vegetative cells and spores of *Bacillus anthracis* surrogate. J Vet Sci. 2021 Jan;22(1):e11. DOI: 10.4142/jvs.2021.22.e11
34. Bento de Carvalho T, Barbosa JB, Teixeira P. Effectiveness and Durability of a Quaternary Ammonium Compounds-Based Surface Coating to Reduce Surface Contamination. Biology (Basel). 2023 Apr 28;12(5):669. DOI: 10.3390/biology12050669
35. Calfee MW, Ryan SP, Abdel-Hady A, Monge M, Aslett D, Touati A, Stewart M, Lawrence S, Willis K. Virucidal efficacy of antimicrobial surface coatings against the enveloped bacteriophage $\Phi 6$. J Appl Microbiol. 2022 Mar;132(3):1813-1824. DOI: 10.1111/jam.15339
36. Fernandes LM, Ramos GLPA, Malta RCR, Nascimento JDS. Tolerance of foodborne *Acinetobacter* spp. to sanitizer agents. J Infect Dev Ctries. 2022 Dec 31;16(12):1845-1851. DOI: 10.3855/jidc.17226
37. Ohashi I, Kobayashi S, Tamamura-Andoh Y, Arai N, Takamatsu D. Disinfectant resistance of *Salmonella* in *in vitro* contaminated poultry house models and investigation of efficient disinfection methods using these models. J Vet Med Sci. 2022 Dec 14;84(12):1633-1644. DOI: 10.1292/jvms.22-0311
38. Vereshchagin AN, Frolov NA, Egorova KS, Seitkalieva MM, Ananikov VP. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. Int J Mol Sci. 2021 Jun 24;22(13):6793. DOI: 10.3390/ijms22136793
39. Bika R, Copes W, Baysal-Gurel F. Comparative Performance of Sanitizers in Managing Plant-to-Plant Transfer and Postharvest Infection of *Calonectria pseudonaviculata* and *Pseudonectria foliicola* on Boxwood. Plant Dis. 2021 Oct;105(10):2809-2821. DOI: 10.1094/PDIS-03-21-0481-RE
40. Schoyer E, Hall K. Environmental Cleaning and Decontamination to Prevent *Clostridioides difficile* Infection in Health Care Settings: A Systematic Review. J Patient Saf. 2020 Sep;16(3S Suppl 1):S12-S15. DOI: 10.1097/PTS.0000000000000749
41. Bennie CJM, Daniels JB, Rao S, Rosychuk RAW, Schissler JR. Efficacy of a quaternary ammonium compound in reducing coagulase-positive staphylococcal colony counts in veterinary dermatology exam rooms following two cleaning instruction protocols. Vet Dermatol. 2022 Jun;33(3):185-e52. DOI: 10.1111/vde.13054
42. Capria VM, Fernandez MO, Walker MM, Bergdall VK. Comparison of Floor Cleaning and Disinfection Processes in a Research Animal Facility. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2022 Nov 1;61(6):644-649. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-22-000042
43. Pascoe MJ, Mandal S, Williams OA, Maillard JY. Impact of material properties in determining quaternary ammonium compound adsorption and wipe product efficacy against biofilms. J Hosp Infect. 2022 Aug;126:37-43. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.03.013
44. Song X, Cvelbar U, Strazar P, Vossebein L, Zille A. Antimicrobial Efficiency and Surface Interactions of Quaternary Ammonium Compound Absorbed on Dielectric Barrier Discharge (DBD) Plasma Treated Fiber-Based Wiping Materials. ACS Appl Mater Interfaces. 2020 Jan 8;12(1):298-311. DOI: 10.1021/acsmi.9b18746
45. Dexter F, Parra MC, Brown JR, Loftus RW. Perioperative COVID-19 Defense: An Evidence-Based Approach for Optimization of Infection Control and Operating Room Management. Anesth Analg. 2020 Jul;131(1):37-42. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004829
46. Maloney B, McKelvie T, Nasir M, Murphy C, Moi M, Mudalige P, et al. The environmental footprint of single-use versus reusable cloths for clinical surface decontamination: a life cycle approach. J Hosp Infect. 2022 Dec;130:7-19. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.006

Информация о соавторе:

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

Information about co-author:

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

Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во **ВВЕДЕНИИ** (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ** должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:
142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
ФБУН ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10

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

Подписку на журналы Издательства «Династия» можно оформить:

В любом почтовом отделении России по объединенному каталогу «Пресса России»

Вопросы практической педиатрии	Индекс: 87946	Инфекционные болезни	Индекс: 12919
Вопросы детской диетологии	Индекс: 12917	Вопросы диетологии	Индекс: 90955
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	Индекс: 12916	Вопросы урологии и андрологии	Индекс: 91823

Через альтернативные подписные издательства

ООО «Урал-Пресса» – www.ural-press.ru
Электронный каталог «Пресса России» – www.pressa-ru.ru

Через сайт издательства www.phdynasty.ru для физических лиц
и через издательство для юридических лиц
с любого номера текущего года на любой период

Наименование журнала	Для физических лиц		Для юридических лиц	
	руб./полугодие	руб./год	руб./полугодие	руб./год
Вопросы практической педиатрии	1800	3600	2400	4800
Вопросы детской диетологии	1800	3600	2400	4800
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	1800	3600	2400	4800
Инфекционные болезни	1200	2400	1600	3200
Вопросы диетологии	1200	2400	1600	3200
Вопросы урологии и андрологии	1200	2400	1600	3200

ВНИМАНИЕ!

Для выставления счета юридическим лицам достаточно прислать заявку по e-mail: podpiska@phdynasty.ru
В заявке необходимо обязательно указать реквизиты организации, название журнала, период подписки, контактный телефон, e-mail и ответственное лицо.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, тел./факс: (495) 660-6004
e-mail: podpiska@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru