

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2024 • ТОМ 9 • №4

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

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

Учредитель

© Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

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

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
ФБУН ГНЦ ПМБ

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

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

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

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

Подписано в печать 25.12.2024

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

К вопросу об использовании бактерий и их метаболитов для терапии онкологических заболеваний 5

Экспериментальные статьи

Разработка биплексного экспресс-теста для выявления эпидемически значимых штаммов *Vibrio cholerae*
Е.В.Баранова, А.Г.Королёва-Ушакова, А.Г.Шевяков, Т.В.Фёдоров, П.В.Соловьёв,
А.А.Горбатов, А.Е.Хомяков, С.Ф.Бикетов 8

Разработка сальмонеллезной вакцины на основе слабоацилированного липополисахарида
Salmonella enterica Enteritidis: биотехнология получения, структурные,
серологические и иммуногенные характеристики препарата
О.И.Науменко, Б.И.Алхазова, С.В.Коробова, А.А.Мироненко, П.А.Стряхин, Н.А.Разваляева,
В.А.Лёдов, В.И.Шмиголь, И.Ю.Курбатова, И.А.Казаков, И.В.Анкудинов, М.Э.Головина,
Н.Н.Карцев, Э.А.Светоч, П.Г.Апарин, И.А.Дятлов 15

Получение мышиных моноклональных антител к белку VcIA спор *Bacillus anthracis*
А.Г.Шевяков, В.А.Яковлева, Е.А.Панферцев, Р.И.Миронова С.Ф.Бикетов, С.С.Ветчинин 25

Изучение свойств поливалентной сыворотки кишечного иерсиниоза,
полученной от экспериментальных животных с применением различных схем иммунизации
Л.Н.Туйчиев, А.М.-Т.Бектимиров, Н.У.Таджиева, О.Ш.Касимов, А.О.Абдуллаев, Ж.А.Анваров, И.Х.Маматкулов 34

Разработка теста на основе изотермической амплификации для диагностики малярии
И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов 41

Кандидатная вакцина на основе модифицированных липополисахаридов *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6 и Y безопасна
и стимулирует секрецию специфических антител у добровольцев, результаты I фазы клинических исследований
В.А.Лёдов, М.А.Головина, Б.И.Алхазова, И.В.Анкудинов, П.А.Стряхин, А.Л.Ковальчук, П.Г.Апарин 49

Изучение диагностической информативности выявления *Helicobacter pylori*
у человека иммунохроматографическим методом
С.Г.Марданлы, С.В.Ротанов, Ю.А.Акиншина, М.А.Ханина 56

Оптимизация метода селекции при конструировании мутантных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*
А.С.Трунякова, Р.З.Шайхутдинова, С.В.Дентовская 64

Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ
для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*
Н.В.Колупаева, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, В.В.Кузин 67

INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*
А.А.Ковалевич, А.С.Водопьянов, С.О.Водопьянов, С.Ю.Темякова 75

Идентификация ботулинического токсина типа А методом масс-спектрометрии
в сочетании с иммуномагнитной сепарацией
А.К.Сурин, Н.А.Петухов, М.А.Шкуратова, А.Е.Хлынцева, М.М.Погозин, Я.О.Романенко, В.В.Фирстова 82

Биологические свойства полиантибиотикорезистентных *Staphylococcus haemolyticus*,
изолированных от коронапозитивных и коронанегативных пациентов с внебольничными пневмониями
А.С.Анисимова, Н.В.Аронова, М.В.Цимбалистова, А.С.Водопьянов, Н.В.Павлович, Е.Н.Гудуева, А.К.Носков 88

Частота встречаемости и особенности лабораторной диагностики *Mycoplasma pneumoniae*
у пациентов с внебольничной пневмонией на территории Луганской Народной Республики
А.А.Востриков, В.В.Бондаренко, А.В.Хохлова 95

Изучение протективных свойств химерного белка OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa*
на моделях синегнойной инфекции у мышей
В.С.Тимофеев, Т.Б.Кравченко, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Ю.О.Гончарова,
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова 100

Филогеномный анализ штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации
Д.А.Ковалев, Н.А.Шапаков, С.В.Писаренко, О.В.Бобрышева, Д.Г.Пономаренко, А.А.Хачатурова, А.Н.Куличенко 107

Антагонистическая активность бактерий рода *Lactobacillus* в отношении ESKAPE-патогенов
Д.А.Чистякова, А.А.Шафикина, М.В.Спивак, И.А.Лягина, А.Р.Мелкумян, Б.А.Нанаева, А.В.Варданян, С.И.Ачкасов 115

Обзорные статьи

Липополисахариды – антигенная основа для вакцинации против септического и эндотоксического шока
С.В.Коробова, О.И.Науменко, Б.И.Алхазова, П.А.Стряхин, Е.В.Кожина, М.Э.Головина, П.Г.Апарин 120

Респираторный микробиом при муковисцидозе
М.В.Фурсов, Е.Е.Пославская, Н.А.Сухаричева, Р.У.Кагазежев, А.Ю.Лебедева, С.А.Красовский 130

Новые технологии

Новые подходы к микробиологическому мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов
И.Е.Самойленко, Н.В.Рудаков 139

Правила оформления статей (основные положения) 144

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

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

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

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

Editorial Board

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

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Abstracting journal is indexed in the Russian Science Citation Index

Editorial Office:

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

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

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

Editor-in-Chief's Introduction

On the issue of using bacteria and their metabolites for the treatment of oncological diseases 5

Experimental Articles

Development of a bplex rapid test to identify epidemiologically significant strains of *Vibrio cholerae*
E.V.Baranova, A.G.Korolyova-Ushakova, A.G.Shevyakov, T.V.Fedorov, P.V.Soloviev,
A.A.Gorbatov, A.E.Khomyakov, S.F.Biketov. 8

Development of a salmonella vaccine based on low acylated lipopolysaccharide *Salmonella enterics Enteritidis*:
 biotechnology process development, structural, serological and immunogenic characteristics of the preparation
O.I.Naumenko, B.I.Alkhazova, S.V.Korobova, A.A.Mironenko, P.A.Stryakhnin, N.A.Razvalyayeva, V.A.Ledov, V.I.Shmigol,
I.Yu.Kurbatova, I.A.Kazakov, I.V.Ankudinov, M.E.Golovina, N.N.Kartsev, E.A.Svetoch, P.G.Aparin, I.A.Dyatlov 15

Production of monoclonal antibodies against the protein BclA from *Bacillus anthracis*
A.G.Shevyakov, V.A.Yakovleva, E.A.Panfertsev, R.I.Mironova, S.F.Biketov, S.S.Vetchinin 25

Studying the properties of polyvalent serum of intestinal yersinosis obtained
 from experimental animals using various immunization scheme
L.N.Tuychiev, A.M.-T.Bektimirov, N.U.Tadjieva, O.Sh.Kasimov,
A.O.Abdullaev, Zh.A.Anvarov, I.Kh.Mamatkulov. 34

Development of an isothermal amplification test for the diagnosis of malaria
I.Yu.Shchit, S.F.Biketov. 41

A candidate vaccine based on modified lipopolysaccharides of *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6 and Y
 is safe and stimulates secretion of serotype-specific antibodies in volunteers, results of phase 1 clinical trial
V.A.Ledov, M.A.Golovina, B.I.Alkhazova, I.V.Ankudinov, P.A.Stryakhnin, A.L.Kovalchuk, P.G.Aparin 49

The study the diagnostic informativeness of the detection of *Helicobacter pylori* in humans
 by immunochromatographic method
S.G.Mardanly, S.V.Rotarov, Yu.A.Akinshina, M.A.Khanina 56

Optimization of selection method in the construction of mutant strains of *Yersinia pseudotuberculosis*
A.S.Trunyakova, R.Z.Shaikhutdinova, S.V.Dentovskaya 64

Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms
N.V.Kolupaeva, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, V.V.Kuzin. 67

INDEL-typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains
A.A.Kovalevich, A.S.Vodopyanov, S.O.Vodopyanov, S.U.Temyakova. 75

Identification of botulinum toxin type A by mass spectrometry combined with immunomagnetic separation
A.K.Surin, N.A.Petukhov, M.A.Shkuratova, A.E.Khlyntseva, M.M.Rogozin, Ya.O.Romanenko, V.V.Firstova 82

Biological properties of multidrug-resistance *Staphylococcus haemolyticus* isolated from coronapositive
 and coronanegative patients with community-acquired pneumonia
A.S.Anisimova, N.V.Aronova, M.V.Tsimbalistova, A.S.Vodopyanov, N.V.Pavlovich, E.N.Gudueva, A.K.Noskov 88

Frequency of occurrence and peculiarities of laboratory diagnostics of *Mycoplasma pneumoniae* in patients
 with out-of-hospital pneumonia on the territory of the Lugansk People's Republic
A.A.Vostrikov, V.V.Bondarenko, A.V.Khokhlova. 95

The study of the protective properties of the chimeric protein OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* on mice models
V.S.Timofeev, T.B.Kravchenko, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, Yu.O.Goncharova, A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova . . 100

Phylogenomic analysis of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation
D.A.Kovalev, N.A.Shapakov, S.V.Pisarenko, O.V.Bobrysheva, D.G.Ponomarenko, A.A.Khachaturova, A.N.Kulichenko. 107

Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria against ESKAPE pathogens
D.A.Chistyakova, A.A.Shafikova, M.V.Spivak, I.A.Lyagina, A.R.Melkumyan, B.A.Nanaeva, A.V.Vardanyan, S.I.Achkasov. 115

Review Articles

Lipopolysaccharides are antigenic basis for vaccination against septic and endotoxic shock
S.V.Korobova, O.I. Naumenko, B.I.Alkhazova, P.A.Stryakhnin, E.V.Kozhinova, M.E.Golovina, P.G.Aparin 120

Respiratory microbiome in cystic fibrosis
M.V.Fursov, E.E.Poslavskaya, N.A.Sukharicheva, R.U.Kagazezhev, A.U.Lebedeva, S.A.Krasovsky. 130

New Technologies

New approaches to microbiological monitoring of natural foci of tick-borne rickettsiosis
I.E.Samoylenko, N.V.Rudakov 139

Instructions for Authors 144

К вопросу об использовании бактерий и их метаболитов для терапии онкологических заболеваний

В настоящее время хорошо известно использование некоторых вирусов для лечения онкологических заболеваний. Это так называемые онколитические вирусы, которые избирательно поражают раковые клетки отдельных видов опухолей. В отношении бактерий такие работы известны в гораздо меньшей степени, хотя имеют не меньшую перспективу практического использования.

Наиболее распространенными методами лечения рака являются хирургическое вмешательство, лучевая терапия, химиотерапия, таргетная терапия и иммунотерапия в различных сочетаниях. Использование потенциала бактерий и продуктов их синтеза для лечения рака стало предметом интенсивных исследований в последнее время в области бактериологии. Бактерии могут быть генетически модифицированы с помощью современных генно-инженерных подходов, включая методы генетического редактирования и синтетической биологии. Основной задачей в данной стратегии является создание бактериальных штаммов или консорциумов из бактерий разных видов, способных точно проникать в ткань опухоли, колонизировать и разрушать ее, не нанося существенного вреда окружающим тканям и организму в целом. Задача нетривиальная, учитывая, что такого рода воздействия происходят в сложной среде *in vivo*.

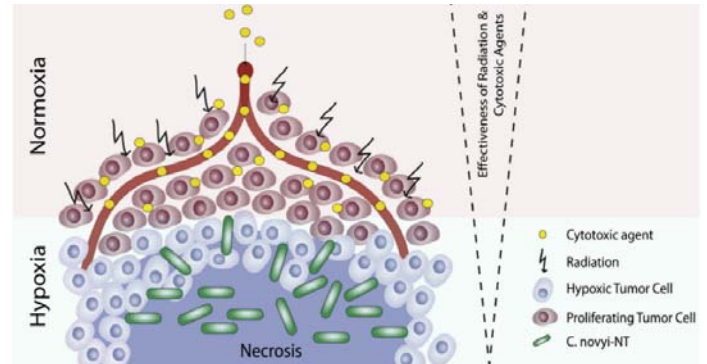
В настоящее время хорошо известно, что многие бактерии связаны с факторами, способствующими развитию опухолей, и канцерогенезом. Некоторые из них могут играть положительную роль в лечении рака. Некоторые виды бактерий, в т.ч. *Clostridia*, *Shigella*, *Lactococcus*, *Bifidobacteria*, *Listeria*, *Salmonella*, *Vibrio* и *Escherichia coli*, обладают высоким потенциалом для использования в лечении рака. Они также обладают мощным противоопухолевым действием. Опухолевые клетки могут снижать способность иммунной системы бороться с заболеваниями, но некоторые бактерии могут положительно влиять на нее.

Наиболее важными компонентами иммунной системы, которые оказывают значительное влияние на подавление злокачественных и аномальных клеток, являются CD8⁺ Т-лимфоциты, макрофаги, NK-клетки, дендритные клетки и регуляторные Т-клетки, которые содержат биомаркер FOXP3. Все упомянутые клетки оказывают значительное влияние на подавление репликации раковых клеток и их уничтожение. CD8⁺ Т-клетки признаны наиболее влиятельными компонентами иммунной системы, подавляющими рост злокачественных клеток.

Некоторые возбудители бактериальных инфекций, в частности вызванных кишечной палочкой, могут быть использованы для подавления опухолевых тканей. Эти инфекции улучшают и ускоряют дифференцировку CD8⁺ Т-киллеров, что приводит к синтезу интерферона- γ и увеличению экспрессии главного комплекса гистосовместимости I типа на раковых клетках. Этот интегративный механизм в конечном итоге может изменить проникновение CD8⁺ Т-клеток в опухолевую ткань.

Бактерии и их метаболиты способны повышать иммунитет организма против злокачественных клеток. Бактерии могут противодействовать раковым клеткам несколькими способами: поглощать и уменьшать количество необходимых питательных веществ для метаболизма раковых клеток в окружающей опухоль среде; генерировать и размножаться в некротических областях, создавая гипоксические условия для неопластических клеток; доставлять противораковые препараты; уничтожать злокачественные клетки, формируя структуры по типу биопленок. Кроме того, бактерии могут вызывать клеточный апоптоз с помощью других механизмов, таких как поглощение свободной чужеродной ДНК, а также повышать свою эффективность при лечении рака и удалении опухолей.

Бактериоботы – это устройства на основе бактерий с аналогичной структурой, которые можно использовать для воздействия на определенные клетки (например, для доставки лекарств или их уничтожения) в



свободной или гранулированной форме. Для повышения эффективности бактериоботов бактерии могут быть инкапсулированы/гранулированы в биоразлагаемые и биосовместимые микрогранулы, которые безопасны для клеток человека. Микрогранулы защищают бактерии от опсонизации и других физиологических изменений, которые могут происходить в организме. ГНЦ ПМБ имеет опыт использования микрокапсул для создания рекомбинантных субъединичных вакцин, одна из которых, против чумы, запатентована и зарегистрирована. Наличие опыта, оборудования и технологий в данной сфере позволит расширить ее использование в области онкологии.

Salmonella Typhimurium использовалась в составе микробота, причем для инкапсуляции бактерий применялись биосовместимые гранулы альгината, а затем жгутики *S. Typhimurium* прикреплялись к микрогранулам в качестве движущей силы. Эксперименты показали, что эти роботизированные бактерии способны эффективно воздействовать на опухоль. Непатогенные кишечные палочки применялись в качестве живых нанороботов для лечения рака, когда они были оснащены синтезированными нанобиосенсорами, связанными с сверхэкспрессированным фактором роста эндотелия сосудов, что позволяло обнаруживать опухолевые клетки и связываться с ними.

Споры бактерий могут активизироваться и прорасти в вегетативную форму при благоприятных условиях, например в гипоксических участках в некротической ткани опухолей. Эти особенности делают анаэробные спорообразующие бактерии идеальным выбором для воздействия на раковые клетки. Генетически модифицированные штаммы *Clostridium novyi*-NT не содержат токсинов и не вызывают побочных эффектов у хозяина. Лизис клеток в опухолевых тканях наблюдается у мышей с раком матки при внутриматочном введении спор *Clostridium histolyticum* или внутривенном введении *Clostridium sporogenes*. Споры бактерий используются в качестве носителей для доставки противораковых соединений, цитотоксических пептидов, терапевтических белков и генетических конструкций.

Измененный штамм *S. Typhimurium* можно использовать в качестве носителя для доставки лекарств в целевые ткани и в качестве инструмента для внесения изменений в гены, кодирующие белки, подавляющие рост опухолей, с помощью генной терапии. С его помощью созданы генетически модифицированные бактерии для лечения рака, когда два гена (*msbB* и *purI*) были полностью удалены из дикого штамма, что эффективно ослабило бактерию, сделав ее зависимой от внешних источников пуриновых нуклеотидов для выживания только в опухоли.

Listeria monocytogenes синтезирует листериолизин, являющийся фактором вирулентности и могущий способствовать выживанию бактерий, препятствует образованию фаголизосом в клетках хозяина, может перфорировать мембрану фагосомы, помогая бактериям выходить из фагосомы и проникать во внутриклеточное пространство. Бактерия имеет широкий спектр применения, например в качестве носителя для доставки вакцины с противоопухолевым ответом. Различные виды этого противоопухолевого вектора находятся на I и II стадиях клинических испытаний для лечения рака простаты и колоректального рака.

Бифидобактерии могут воздействовать на опухолевые клетки, влияя на иммунный ответ организма, и оказывать противораковое действие, изменяя микробиоту кишечника и синтезируя противораковые молекулы. Споры некоторых видов *Clostridium* (анаэробные бактерии) проникают в гипоксические ядра опухолей и способны воздействовать на раковые клетки и опухоли с частичным их лизисом. Использование непатогенной кишечной палочки для программируемого лизиса в микроокружении опухоли с высвобождением закодированного наноантитела-антагониста CD47 позволило вызвать значительную регрессию опухоли, активацию Т-клеток и предотвращение метастазирования.

Бактериальные пептиды, выделяемые бактериями и обладающие противораковыми свойствами, в настоящее время интенсивно изучаются. Из наиболее важных с противоопухолевыми свойствами следует отметить аренамиды, галиторалины, идоглобомуиды А и В, луцентамицины, миксирины, уруктхпельстатин, энтап, Рер27anal2 и рибосомный белок *Helicobacter pylori*.

Перспективными противораковыми препаратами являются бактериоцины – низкомолекулярные микробные пептиды. Бовицин HC5, низин А, педиоцины, ферментицин HV6b, колицины и пиоцин S2 являются важнейшими молекулами с противоопухолевыми свойствами. Эта группа бактериальных метаболитов изучается в ГНЦ ПМБ уже более двух десятилетий с целью получения антибактериальных продуктов. Накоплен большой арсенал штаммов (более 3000) с такими свойствами, разработаны технологии получения и очистки продуктов. Данный опыт и уникальная коллекция непременно должны быть использованы для поиска антиопухолевых молекул.

Интерес к бактериальным токсинам лежит не только в сфере разработок препаратов для диагностики и купирования токсических состояний, но и в области их возможного использования в качестве противоопухолевых препаратов. Так, дифтерийный токсин, выделяемый *Corynebacterium diphtheria*, вызывает подавление метастазирования и пролиферацию опухоли, снижение ангиогенеза в месте локализации опухоли, индукцию апоптоза, ингибирование гепарин-связывающего эпидермального фактора роста, благодаря чему оказывает противораковое действие и проявляет противоопухолевые свойства. *Clostridium difficile* синтезирует два ток-

сина: цитотоксин (TcdB) и энтеротоксин (TcdA). TcdB проявляет противораковую активность, стимулируя синтез провоспалительных хемокинов и цитокинов, подавляя размножение опухолевых клеток и вызывая некроз и апоптоз, а также способствует формированию долгосрочного противоопухолевого иммунитета к различным линиям раковых клеток и линиям клеток рака толстой кишки. Шигатоксин 1 (Stx-1) вырабатывается *E. coli* и вызывает гемолитико-уремический синдром. Одновременно у него есть мембранный рецептор Globotriaosylceramide (Gb3), который экспрессируется в широком спектре линий раковых клеток человека с множественной лекарственной устойчивостью. Токсин продемонстрировал противоопухолевую активность и может останавливать клеточный цикл в клеточной линии HCT116 рака толстой кишки. Экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* выполняет функцию АDB-рибозилирования и ингибирует активность фактора элонгации-2, ингибирует синтез белка, вызывая апоптоз в раковых клетках. В сочетании с эпидермальным фактором роста человека и интерлейкином-4 токсин показал мощную противоопухолевую активность в клеточных линиях рака поджелудочной железы PaCa-2.

Бактериальных ферментов, перспективных в качестве противоопухолевых средств, не так много, что, видимо, связано с недостаточностью исследований в этой сфере. Известен бактериальный фермент аргининдезаминаза-I, который синтезируют *Mycoplasma hominis* или *M. arginine*. Фермент расщепляет и преобразует аргинин в цитруллин, что приводит к высвобождению аммония. При конъюгировании с полиэтиленгликолем он оказывает противораковое действие, вызывая апоптоз и снижая физиологический метаболизм опухолевых клеток, а также подавляет рост опухолевых клеток и вызывает аутофагию. Испытания препарата находятся на II клинической фазе для лечения карциномы печени.

Одним из направлений является использование природных интратуморальных бактерий, изолированных из биопсий солидных опухолей мышины колоректальной карциномы у живых мышей: интратуморальная бактерия *Proteus mirabilis* и пурпурная фотосинтетическая бактерия *Rhodopseudomonas palustris*. Их использование может преодолеть недостатки современной иммунотерапии рака на основе бактерий. Этот бактериальный консорциум может расти и размножаться в целевой опухолевой среде, что эффективно вызывает разрушение опухолевых клеток, а иммунные клетки проникают в опухоль и вызывают сильные противораковые реакции в целевых опухолях. Композитный искусственный каркас (скаффолд) из полидиметилсилоксана, инкапсулирующий активируемый светом TiO₂, в экспериментах по лечению рака молочной железы существенно усилил терапевтический эффект в сингенных и ортотопических моделях. Это направление можно рассматривать как пока наиболее перспективное из всех приведенных выше вариантов использования бактерий в онкологии.

Далее приведу несколько ссылок на статьи, материал которых использован для подготовки данного сообщения: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.156378>, <https://doi.org/10.1007/s40487-021-00177-x>, <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0297-0>, <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0180-y>, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189112>. В этих публикациях описаны все современные проблемы, связанные с использованием бактерий в онкологии, даны ссылки на подробное описание используемых методологий.

Развитие технологий геной инженерии, особенно геного редактирования, позволило более оптимистично рассматривать возможность использования бактерий в онкологии. Здесь следует привести несколько основных механизмов воздействия бактерий на клетку.

1. Бактерии, внедренные в опухоль, потребляют доступный кислород и питательные вещества и могут привести к гибели раковых клеток.

2. Бактерии могут синтезировать различные химические соединения, которые оказывают противоопухолевое действие.

3. Бактерии можно использовать в качестве носителя противораковых препаратов.

4. Стимуляция иммунной системы бактериями часто приводит к иммунотерапевтическому эффекту.

5. После уничтожения опухолевых клеток использованные бактерии можно удалить, чтобы предотвратить нежелательные последствия.

В любом случае, даже при разработке высокоэффективного и целевого способа лечения онкозаболеваний с помощью бактерий, терапия будет комплексной, сочетающейся с другими средствами и методами, и такие разработки ведутся именно в этом направлении.

Современные достижения отечественной бактериологии, связанные с фундаментальными вопросами функционирования и взаимодействия клеток бактерий с другими организмами, создание баз данных, включающих в себя полный геном и фенотип микроорганизмов из обширных коллекционных фондов живых культур, формирование интерактивных каталогов и поисковых систем позволяют на новом уровне подойти к решению вопроса об использовании бактерий и их метаболитов в онкологии, надеяться на расширение работ в данной области и получение положительных практических результатов.

Разработка биплексного экспресс-теста для выявления эпидемически значимых штаммов *Vibrio cholerae*

Е.В.Баранова, А.Г.Королёва-Ушакова, А.Г.Шевяков, Т.В.Фёдоров, П.В.Соловьёв,
А.А.Горбатов, А.Е.Хомяков, С.Ф.Бикетов

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

Потенциал эпидемической опасности бактерий *Vibrio cholerae*, циркулирующих в природе, определяется способностью к продукции комплекса факторов патогенности, в первую очередь холерного токсина. С другой стороны, опыт вспышек и эпидемий холеры указывает на то, что наиболее часто они вызываются штаммами *V. cholerae* серогруппы O1. Мембранный иммунохроматографический анализ с наночастицами золота в качестве репортеров сигнала является востребованным инструментом экспресс-диагностики ряда возбудителей инфекционных заболеваний, в т.ч. и особо опасных. На основе моноклональных антител к холерному токсину и липополисахариду *V. cholerae* O1 разработан иммунохроматографический тест (ИХТ) для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров *V. cholerae*. Проведена наработка экспериментальных серий ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺». Представлены предварительные результаты исследования рабочих характеристик разработанного ИХТ с использованием бульонных культур 10 штаммов *V. cholerae*. Показано, что чувствительность ИХТ при определении липополисахарида *V. cholerae* серогруппы O1 составила 100%, при определении холерного токсина – 87,5%.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерный токсин, серогруппа O1, иммунохроматография, экспресс-тест

Для цитирования: Баранова Е.В., Королёва-Ушакова А.Г., Шевяков А.Г., Фёдоров Т.В., Соловьёв П.В., Горбатов А.А., Хомяков А.Е., Бикетов С.Ф. Разработка биплексного экспресс-теста для выявления эпидемически значимых штаммов *Vibrio cholerae*. Бактериология. 2024; 9(4): 8–14. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-8-14

Development of a bplex rapid test to identify epidemiologically significant strains of *Vibrio cholerae*

E.V.Baranova, A.G.Korolyova-Ushakova, A.G.Shevyakov, T.V.Fedorov, P.V.Soloviev,
A.A.Gorbatov, A.E.Khomyakov, S.F.Biketov

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

The potential for epidemic danger of *Vibrio cholerae* bacteria circulating in nature determine by the ability to produce a complex of pathogenicity factors, primarily cholera toxin (CT). On the other hand, experience with cholera outbreaks and epidemics indicates that they most often caused by *V. cholerae*, which belongs to serogroup O1. Membrane immunochromatographic analysis with gold nanoparticles as signal reporters is a popular tool for express diagnostics of a number of infectious pathogens, including highly dangerous ones. Based on monoclonal antibodies to cholera toxin and to lipopolysaccharide *V. cholerae* O1, developed an immunochromatographic test (ICT) for the simultaneous detection of O1 and Tox⁺ markers of *V. cholerae*. Experimental batches of ICT "*V. cholerae* O1 Tox⁺ test strip" were developed. In this paper, the team of authors presents the preliminary results of a study of the working characteristics of 10 strains of *V. cholerae* strains developed by ICT using broth cultures of 10 strains of *V. cholerae* strains. It was shown that the sensitivity of ICT in the determination of LPS of *V. cholerae* serogroup O1 was 100%, in the determination of cholera toxin – 87.5%.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera toxin, serogroup O1, immunochromatography, rapid test

For citation: Baranova E.V., Korolyova-Ushakova A.G., Shevyakov A.G., Fedorov T.V., Soloviev P.V., Gorbatov A.A., Khomyakov A.E., Biketov S.F. Development of a bplex rapid test to identify epidemiologically significant strains of *Vibrio cholerae*. Bacteriology. 2024; 9(4): 8–14. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-8-14

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 10.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Evgenia V. Baranova, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms 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

The article was received 10.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

В настоящее время сохраняются эпидемиологические риски завоза холеры из эндемичных стран на любую административную территорию Российской Федерации. Кроме этого, имеются риски эпидемического проявления холеры на территориях субъектов Российской Федерации, находящихся в условиях чрезвычайной ситуации, в связи с контактами людей с водными объектами, контаминированными холерными вибрионами. Россия постоянно сталкивается с импортированными возбудителями инфекции, за счет которых формируются местные очаги холеры. В условиях отсутствия эпидемических проявлений холеры не исключается вероятность эпизодического обнаружения в пробах воды токсигенных штаммов O1-серогруппы вследствие неустоенных заносов с неблагополучных по холере территорий [1]. По данным Референс-центра по холере, на территории России в последние годы холерные вибрионы были выделены из объектов окружающей среды на территориях Донецкой Народной Республики, Ростовской области, Республики Калмыкия, Краснодарского края, Иркутской области, Забайкальского края, Республик Бурятия и Коми, Хабаровского края.

Рост заболеваемости холерой в мире наблюдается с 2021 г. С начала 2024 г. по состоянию на сентябрь 2024 г. в общей сложности было зарегистрировано 429 700 случаев холеры и 3400 случаев смерти от этого заболевания в 31 стране в пяти регионах, наблюдаемых Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [2]. В настоящее время к числу стран, наиболее серьезно затронутых этим заболеванием, относятся Афганистан, Пакистан, Йемен, Сирия, Зимбабве, Замбия, Эфиопия, Мозамбик, Гаити, Демократическая Республика Конго, Сомали, Судан, Коморские острова, Мьянма, Индия, Нигерия, Танзания. В ряде вспышек отмечаются высокие показатели летальности, превышающие пороговый уровень в 1%. Данные показатели свидетельствуют о неуклонном росте количества заболевших.

Интерес к средствам экспресс-выявления возбудителя холеры определяется стремлением получить результаты исследования в максимально короткие сроки; возможностью проведения анализа с использованием нативного материала или элективных сред; высокой специфичностью, простотой и воспроизводимостью метода. Поэтому в последние годы экспресс-тесты (в англоязычной литературе: Rapid test, LF-test, LF-biosensor) для обнаружения холерного вибриона все чаще применяются при возникновении вспышек в эндемичных регионах Африки и Азии при решении вопроса организации противоэпидемических мероприятий.

Иммунохроматографические тесты (ИХТ) могут использоваться персоналом у постели больного или в месте оказания помощи больным с подозрением на холеру и не требуют создания и обслуживания «холодовой транспортной цепи» или использования сложного оборудования. При расследовании случаев холеры в условиях недостаточных лабораторных ресурсов ИХТ были рекомендованы ВОЗ для выявления возбудителя холеры при реагировании на вспышки, хотя до сих пор нет рекомендаций по их систематическому использованию в целях мониторинга за возбудителем [3, 4]. Биосенсоры на основе иммунохроматографического анализа (ИХА) позволяют в течение 5–20 мин обнаружить патоген в исследуемом образце. На рис. 1 приведена схема работы ИХТ для выявления антигенов.

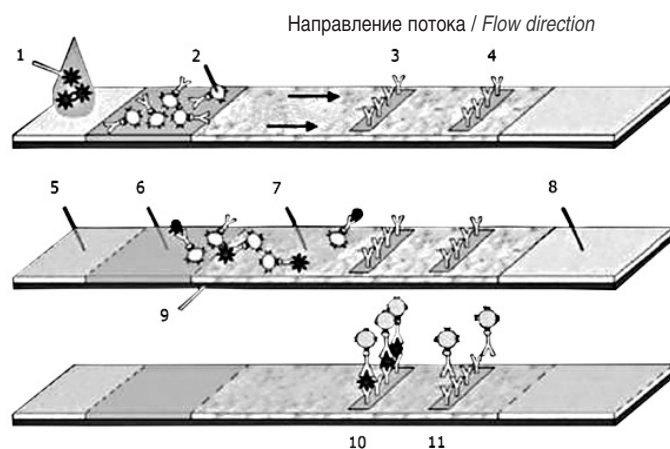


Рис. 1. Принцип работы ИХТ для выявления антигенов: 1 – исследуемая проба; 2 – конъюгат специфичных антител с наночастицами; 3 – иммобилизованные специфичные антитела в тестовой зоне; 4 – иммобилизованные антивидовые иммуноглобулины в контрольной зоне; 5 – подушечка для впитывания пробы; 6 – подушечка для конъюгата; 7 – нитроцеллюлозная мембрана; 8 – подушечка для абсорбции реагентов; 9 – подложка для мембраны; 10 – тестовая полоска; 11 – контрольная полоска.

Fig. 1. Operating principle of the ICT for detection of antigens: 1 – test sample; 2 – conjugate of specific antibodies with nanoparticles; 3 – immobilized specific antibodies in the test zone; 4 – immobilized anti-species immunoglobulins in the control zone; 5 – pad for sample absorption; 6 – pad for conjugate; 7 – nitrocellulose membrane; 8 – pad for reagent absorption; 9 – membrane substrate; 10 – test strip; 11 – control strip.

За рубежом производится ряд ИХТ для выявления холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и холерного токсина (ХТ) [5–8]. Одной из целей при разработке быстрых тестов для обнаружения возбудителя холеры является достижение чувствительности и специфичности не менее 90 и 85% соответственно (рекомендация целевой группы ВОЗ по борьбе с холерой) [9].

Цель исследования. Разработка первого отечественного ИХТ для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *Vibrio cholerae*. В данной статье представлены основные этапы работы по созданию ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» и результаты лабораторно-экспериментального исследования его рабочих характеристик.

Материалы и методы

В работе использовали микробиологические, биохимические, иммунохимические методы и методы гибридной технологии. Материалом для исследований явились моноклональные антитела к липополисахариду (ЛПС) *V. cholerae* O1 серогруппы и к ХТ. Работы проводились на базе отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск.

Микроорганизмы

Штаммы холерного вибриона и гетерологичных микроорганизмов получены из Коллекции патогенных бактерий ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (в рамках выполненных работ по контракту №203А/2023) и из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ. Штаммы холерного вибриона и гетерологичных микроорганизмов: *V. cholerae* O139 59 Din; *V. cholerae* O139 И-13;

V. cholerae El Tor И-1334; *V. cholerae* El Tor И-1181; *V. cholerae* 569В; *V. cholerae* O139 И-16; *V. cholerae* El Tor И-1327; *V. cholerae* El Tor И-576; *V. cholerae* El Tor И-1264; *V. cholerae* El Tor И-477; *V. cholerae* не O1/O139 1-09; *V. cholerae* не O1/O139 1-11; *V. cholerae* не O1/O139 1-12; *V. metschnikovii* 5; *V. vulnificus* И-157; *V. parahaemolyticus* И-188; *Escherichia coli* 52; *Shigella dysenteriae* 63/2; *Salmonella Typhimurium* 14.

Получение ЛПС *V. cholerae* O1

ЛПС *V. cholerae* O1 выделен и очищен из штамма *V. cholerae* 569В по методу O.Westphal и K.Jann [10].

Получение холерного токсина

ХТ выделен по методу J.J.Mekalanos из фильтрата бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В [11].

Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител

Моноклональные антитела (МКА) получали с использованием ЛПС *V. cholerae* O1, ХТ и мышей линии BALB/c. Для гибридизации были использованы подколенные лимфоузлы иммунизированных мышей. Гибридизацию иммунных лимфоцитов и клеток мышиной миеломы линии P3-X63-Ag8.653 проводили по стандартной методике [12] при помощи полиэтиленгликоля 4000. Тестирование супернатантов гибридом проводили на 7–9-й день после гибридизации методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Выделение и очистку МКА из культуральных и асцитических жидкостей проводили на колонке с белок А сефарозой. Выделенные иммуноглобулины концентрировали осаждением при помощи сухого сульфата аммония (до 50% насыщения) и переводили в фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 емкостью 10 мл по прилагаемой инструкции.

Методы анализа МКА

Определение константы аффинности МКА проводили методом ИФА по J.D.Beatty [13]. Анализ специфической активности МКА проводили с использованием методов дот-блот [14], вестерн-блот [15] и ИФА [16].

Синтез коллоидного золота с размером частиц 40 нм

К 48,5 мл деионизованной воды (18,2 Мом/см) добавляли при постоянном перемешивании 150 мкл 10%-го раствора золотохлористоводородной кислоты. Смесь доводили до кипения, добавляли 1,5 мл 1%-го раствора цитрата натрия. Смесь продолжали кипятить с перемешиванием 25 мин до появления устойчивой рубиново-красной окраски. Полученную суспензию коллоидного золота (КЗ) охлаждали до комнатной температуры и хранили при температуре 4–6°C. Оптическую плотность раствора КЗ определяли спектрофотометрически. Определение флокуляционных кризисов проводили по G.T.Hermanson [17].

Материалы и оборудование для изготовления лабораторных образцов набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox+»

В работе использовали мембранные материалы (Advanced Microdevices, Индия), диспенсер IsoFlow (Imagene Technology,

США) для формирования аналитических и контрольной зон, автоматический гильотинный нарезчик ИХТ Index Cutter (A-Point Technologies, США), климатическую камеру (Mettler, Германия), запаиватель с микроконвейером FR-900 (Wenzhou dingli packing machinery, Китай), вакуумный упаковщик Boxer 35 (Henkelman, Нидерланды).

Проведение иммунохроматографического анализа

Для проведения ИХА использовали разработанный при выполнении данной работы набор реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox+» для одновременного выявления O1- и Tox+ маркеров патогенных штаммов *V. cholerae* производства ФБУН ГНЦ ПМБ (лабораторная серия 8, произведен 15.02.2024). ИХА проводили согласно проекту инструкции по применению набора реагентов. С помощью автоматического дозатора с наконечником вносили 150 мкл исследуемого образца в пробирки для проведения анализа, туда же помещали тест-полоски. Учет результата проводили через 20 мин в соответствии со схемой интерпретации результатов (рис. 2).

Образец считали отрицательным на наличие ХТ и ЛПС *V. cholerae* O1, если имеется одна окрашенная линия в контрольной зоне.

Образец считали положительным на наличие ХТ, если имеются окрашенные линии в тестовой зоне 1 и в контрольной зоне.

Образец считали положительным на наличие ЛПС *V. cholerae* O1, если имеются окрашенные линии в тестовой зоне 2 и в контрольной зоне.

Анализ считали не валидным в случае отсутствия окрашивания линии в контрольной зоне.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение и характеристика МКА, специфичных к ЛПС *V. cholerae* O1 и ХТ *V. cholerae*

Работу проводили согласно методикам, представленным в разделе «Материалы и методы». Наиболее важным этапом работы являлся отбор гибридомных клеток с перспективой дальнейшего использования полученных МКА в каче-

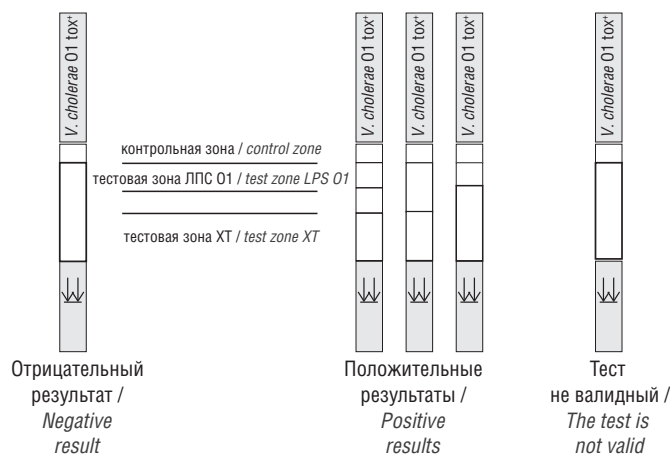


Рис. 2. Интерпретация результата анализа с использованием набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox+».
Fig. 2. Interpretation of the test result using the reagent kit «Test strip *V. cholerae* O1 Tox+».

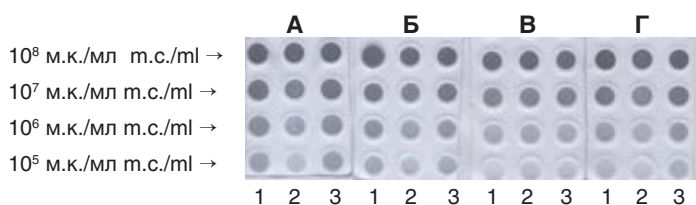


Рис. 3. Дот-блот моноклональных антител к ЛПС *V. cholerae* O1: 1 – *V. cholerae* EI Tor И-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor И-1264; 3 – *V. cholerae* 569В. А – дот-блот МА 2G12; Б – дот-блот МА 1С4; В – дот-блот МА 6D8; Г – дот-блот МА 3Е7.

Fig. 3. Dot blot of monoclonal antibodies to LPS *V. cholerae* O1: 1 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1264; 3 – *V. cholerae* 569B. A – dot blot MA 2G12; B – dot blot MA 1C4; C – dot blot MA 6D8; G – dot blot MA 3E7.

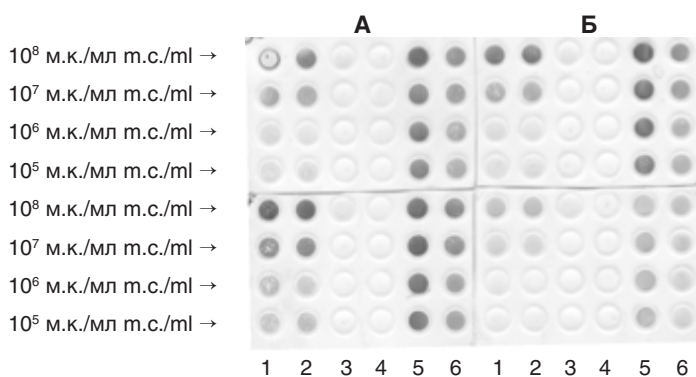


Рис. 4. Дот-блот моноклональных антител к холерному токсину. Препараты микробных клеток: 1 – *V. cholerae* EI Tor И-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor И-1264; 3 – *V. cholerae* O139 И-16; 4 – *V. cholerae* EI Tor И-1327; 5 – *V. cholerae* 569В; 6 – *V. cholerae* EI Tor И-1334. А – дот-блот МА СН6; Б – дот-блот МА СЕ5; В – дот-блот МА СН13; Г – дот-блот МА СН8.

Fig. 4. Dot blot of monoclonal antibodies to cholera toxin. Microbial cell preparations: 1 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1264; 3 – *V. cholerae* O139 I-16; 4 – *V. cholerae* EI Tor I-1327; 5 – *V. cholerae* 569B; 6 – *V. cholerae* EI Tor I-1334. A – dot blot MA CH6; B – dot blot MA CE5; C – dot blot MA CH13; G – dot blot MA CH8.

стве компонентов ИХТ. С учетом поставленной перед нами задачи были сформулированы определенные требования отбора гибридных клеток, включающие следующие параметры:

а) стабильность клеточной линии – не менее 5 успешных пересевов на питательной среде и не менее 5 успешных пассажей на мышах линии BALB/с без снижения специфической активности;

б) продуктивность гибридом – не менее 0,1 мг иммуноглобулинов на 1 мл культуральной жидкости и не менее 2 мг – на 1 мл асцита;

в) специфичность МКА – взаимодействие с антигенами и целыми клетками холерного вибриона, отсутствие перекрестных реакций с вибрионами других видов и гетерологичными микроорганизмами;

г) аффинность МКА – константа аффинности к антигенам и целым клеткам холерного вибриона не ниже 10^8 M^{-1} ;

д) класс МКА – иммуноглобулины класса G.

Гибридные клоны, показавших наибольшую активность в ИФА, были клонированы 2–4 раза методом предельных разведений.

Селекцию МКА к ЛПС O1 серогруппы возбудителя холеры и ХТ проводили путем оценки их диагностической ценности в ИФА, методами дот-блот и вестерн-блот. На рис. 3 пред-

ставлен пример дот-блота МКА к ЛПС *V. cholerae* O1 серогруппы с цельными клетками холерного вибриона O1 серогруппы. Чувствительность МКА 2G12 в дот-блоте составила 10^5 м.к./мл.

На рис. 4 представлен пример дот-блота МКА к ХТ с микробными клетками холерного вибриона. Чувствительность МА СН13 составила 10^5 м.к./мл.

Подбор пар аддитивных высокоаффинных МКА к ЛПС O1 серогруппы холерного вибриона и ХТ проводили в сэндвич-варианте ИФА с использованием биотинилированных МКА. Для выявления ЛПС холерного вибриона серогруппы O1 установлено 3 пары МКА: 2G12 – 1C4-биотин; 6D8 – 1C4-биотин; 6D8 – 3E7-биотин, а для выявления ХТ – две пары МКА: СН13 – СЕ5-биотин и СН6 – СЕ5-биотин. Результаты, полученные в ряде иммунохимических исследований, позволили нам рассматривать полученные МКА в качестве перспективных биокомпонентов для конструирования иммунохроматографического экспресс-теста для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae*.

Конструирование лабораторных образцов иммунохроматографического экспресс-теста для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae* «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺»

Принцип ИХА для одновременного (биплексного) выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae*

На первой стадии ИХА происходит взаимодействие коллоидных конъюгатов (№1 – конъюгат КЗ с токсин-связывающими МКА, №2 – конъюгат КЗ с ЛПС O1-связывающими МКА) с антигенами-мишенями экспресс-теста в исследуемой пробе. Затем фронт жидкости с образовавшимися иммунными комплексами антиген-антитело-КЗ последовательно проходит аналитическую зону 1, которая представляет собой участок мембраны с иммобилизованными МКА к ХТ, аналитическую зону 2, которая представляет собой участок мембраны с иммобилизованными МКА к ЛПС O1 группы холерного вибриона. Иммунный комплекс конъюгата КЗ с ХТ связывается с аналитической зоной 1, в результате чего образуется окрашенный преципитат. Соответственно иммунные комплексы конъюгата КЗ с ЛПС O1 серогруппы холерного вибриона связываются с аналитической зоной 2, в результате чего также образуется окрашенный преципитат. Степень связывания иммунных комплексов с иммобилизованными в аналитических зонах антителами и, соответственно, интенсивность окрашивания мембраны определяются концентрацией специфических холерных маркеров в исследуемой пробе. Контрольная зона представляет собой участок мембраны с иммобилизованными антимишными антителами класса G кролика и окрашивается за счет связывания конъюгатов КЗ №1 и №2, независимо от наличия в пробе антигенов-мишеней. На рис. 5 представлен пример проведения исследования бульонных культур штаммов *V. cholerae* (10^7 м.к./мл).

Для конъюгирования с КЗ были взяты очищенные МКА к ХТ СЕ5 и 1С4 к ЛПС *V. cholerae* O1 серогруппы. Размер частиц золота в данных конъюгатах составлял 40 нм. Оптическая плотность КЗ при $\lambda = 540$ нм составляла 10,0 оптических единиц.

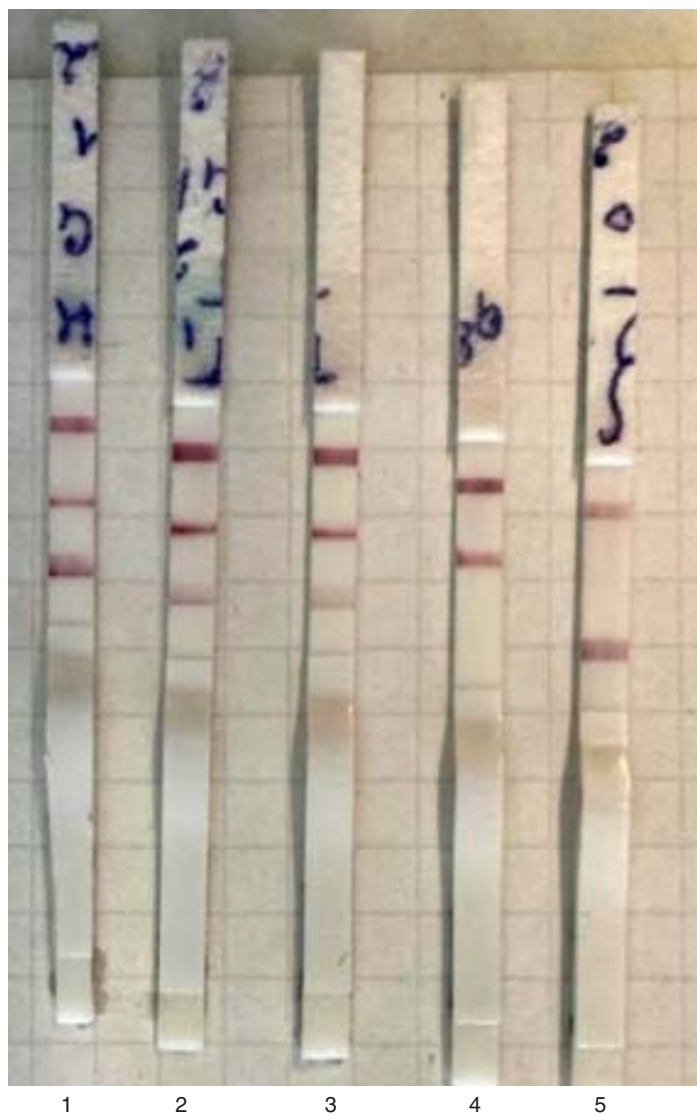


Рис. 5. Иммунохроматографический анализ бульонных культур штаммов *V. cholerae*. Бульонные культуры штаммов: 1 – *V. cholerae* 569B; 2 – *V. cholerae* EI Tor И-1334; 3 – *V. cholerae* EI Tor И-1181; 4 – *V. cholerae* EI Tor И-1327; 5 – *V. cholerae* O139 59 Din.
 Fig. 5. Immunochromatographic analysis of broth cultures of *V. cholerae* strains. Broth cultures of strains: 1 – *V. cholerae* 569B; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1334; 3 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 4 – *V. cholerae* EI Tor I-1327; 5 – *V. cholerae* O139 59 Din.

Для формирования аналитической зоны 1 на мембрану ИХТ наносили раствор МКА СН13 к ХТ в ФСБ. Для формирования аналитической зоны 2 на мембрану ИХТ наносили раствор МКА 2G12 к ЛПС *V. cholerae* O1серогруппы в ФСБ. Для формирования контрольной зоны на мембрану ИХТ наносили раствор антивидовых антител (кроличьи против иммуноглобулинов мыши, «ИМТЕК», Россия) в ФСБ.

При выборе материалов для конструирования экспресс-теста оценивали следующие параметры: сорбционная емкость, однородность формирующихся аналитических и контрольных зон, равномерное продвижение фронта жидкости при исследовании, а также низкий уровень неспецифической сорбции коллоидных конъюгатов на мембране.

Результаты экспериментального изучения рабочих характеристик набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺»

Для оценки специфичности экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» использовали бульонные культуры в концентрации 10⁹ м.к./мл: *V. cholerae* не O1/O139 1-09; *V. cholerae* не O1/O139 1-11; *V. cholerae* не O1/O139 1-12; *E. coli* 52; *S. dysenteriae* 63/2; *V. metschnikovii* 5; *S. Typhimurium* 14; *V. vulnificus* И-157; *V. parahaemolyticus* И-188. В результате экспериментов установлено отсутствие перекрестного реагирования. Таким образом, образцы разработанного иммунохроматографического экспресс-теста для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae* обладали 100%-й специфичностью в отношении близкородственных и гетерологичных микроорганизмов.

Чувствительность исследованных образцов экспресс-теста в отношении бульонных культур штаммов возбудителя холеры O1 группы в концентрации 10⁸ м.к./мл составила 100%. Чувствительность исследованных образцов экспресс-теста в отношении бульонных культур токсигенных штаммов *V. cholerae* EI Tor и классического биоваров в концентрации 10⁸ м.к./мл составила 87,5%. Так, из 8 взятых в исследование бульонных культур токсигенных штаммов *V. cholerae* с генотипом *ctxAB*⁺*tcpA*_{elit}⁺ (*V. cholerae* EI Tor O1 и *V. cholerae* O139) и *ctxAB*⁺*tcpA*_{elit}⁻ (*V. cholerae* O1) в 7 (87,5%) обнаружено наличие ХТ. Штаммы *V. cholerae*, не содержащие в геноме детерминант ХТ (*V. cholerae* O139 И-16, *V. cholerae* EI Tor

Таблица. Результаты оценки чувствительности экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺»
 Table. Results of the sensitivity assessment of the rapid test "Test strip *V. cholerae* O1 Tox⁺"

№ пп	Наименование и номер штамма / Name and number of strain	Генотип / genotype		Опыт 1 / Experiment 1		Опыт 2 / Experiment 2	
		<i>ctxAB</i>	<i>tcpA</i> _{elit}	выявлен ЛПС O1 / LPS O1 detected	выявлен ХТ / CT detected	выявлен ЛПС O1 / LPS O1 detected	выявлен ХТ / CT detected
1.	<i>V. cholerae</i> O139 59 Din	+	+	–	+	–	+
2.	<i>V. cholerae</i> O139 И-13	+	+	–	+	–	+
3.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1334	+	+	+	+	+	+
4.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1181	+	+	+	+	+	+
5.	<i>V. cholerae</i> 569B	+	–	+	+	+	+
6.	<i>V. cholerae</i> O139 И-16	–	–	–	–	–	–
7.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1327	–	–	+	–	+	–
8.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-576	+	+	+	–	+	–
9.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1264	+	+	+	+	+	+
10.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-477	+	+	+	+	+	+

И-1327), показали отрицательный результат тестирования экспресс-теста (таблица).

Таким образом, проведенное в двух повторах исследование показало, что аналитическая чувствительность исследования с использованием биплексного экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» к ЛПС *V. cholerae* O1 для бульонных культур исследуемой группы штаммов составила 100% (с воспроизводимостью – 100%), аналитическая чувствительность на наличие у вибрионов маркера ХТ – 87,5% (с воспроизводимостью – 100%). Рабочие характеристики экспресс-теста, изготовленного из отечественных биокомпонентов, показывают перспективность его использования на практике для выявления маркеров эпидемически значимых штаммов *V. cholerae*. По результатам технических испытаний экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» получено положительное заключение на соответствие требованиям нормативной, технической и эксплуатационной документации.

Обсуждение

Раннее выявление случаев заболевания холерой и их подтверждение имеют решающее значение для оперативно-го осуществления противоэпидемических мероприятий. За рубежом ряд ведущих мировых производителей выпускают ИХТ для выявления холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и ХТ, которые обладают удовлетворительной диагностической точностью, соответствующей рекомендациям ВОЗ. При прямом тестировании образцов стула пациентов средняя чувствительность и специфичность ИХТ составляет 90 и 86% соответственно. С помощью мета-анализа проведена оценка диагностической точности экспресс-тестов для выявления холерного вибриона O1 серогруппы ряда ведущих мировых производителей [18]. Авторы провели поиск в четырех базах данных (Medline, EMBASE, Google Scholar и Web of Science до 8 сентября 2021 г.) в поисках исследований, в которых оценивали экспресс-тесты для выявления *V. cholerae* O1. Проведен двумерный мета-анализ случайных эффектов для расчета совокупной чувствительности и специфичности быстрых тестов на холеру. Всего в этот мета-анализ было включено 20 исследований: из Африки ($n = 11$), Азии ($n = 7$) и Америки (Гаити; $n = 2$). Авторы оценили 8 экспресс-тестов: Crystal VC-O1, Crystal VC, Cholkit, Cholera dipstick test (Institute Pasteur Paris), SD Bioline, Artron, Cholera Smart O1 и Smart II Cholera O1. По результатам мета-анализа был сделан вывод, что используемые методы экспресс-тестирования возбудителя холеры обладают умеренной чувствительностью и специфичностью, редко достигающими 100%. Отмечены различия в чувствительности и специфичности ИХТ различных производителей и зависимость от условий проведения анализа и времени от начала клинических проявлений заболевания [5, 6, 7, 19]. Учитывая тот факт, что количество вибрионов, присутствующих у пациентов с острой холерой, может достигать 10^9 КОЕ/мл стула [20], а чувствительность ИХТ обычно составляет $\sim 10^{7-8}$ КОЕ в мл, проблем с выявлением возбудителя в острой фазе заболевания с помощью разработанного ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» быть не должно.

В России не производят тестов для прямого тестирования клинических образцов, поэтому разработка, испыта-

ния и внедрение в практику подобных ИХТ является актуальной задачей. Разработанный на основе МКА, полученных из гибридом, имеющихся в отделе иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, экспресс-тест «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» позволяет определить в бульонных культурах одновременно два фактора патогенности возбудителя холеры – ЛПС *V. cholerae* O1 серогруппы и ХТ – с чувствительностью 100 и 87,5% соответственно. Специфичность теста составляет 100%. Планируется повысить его аналитическую чувствительность и адаптировать для прямого тестирования образцов стула пациентов.

Заключение

Традиционные методы определения токсигенности и серогрупповой принадлежности изолятов *V. cholerae* могут занять более трех дней, а также требуют хорошей лабораторной инфраструктуры, поэтому на сегодняшний день актуальна разработка экспрессных методов. Выявление одновременно двух маркеров – O1 и Tox⁺ – в одном изоляте *V. cholerae* несомненно указывает на его высокий потенциал эпидемической опасности. Представленные в данной работе предварительные результаты исследования рабочих характеристик разработанного ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» с использованием бульонных культур 10 штаммов *V. cholerae* показали, что чувствительность ИХТ при определении ЛПС *V. cholerae* серогруппы O1 составила 100%, при определении холерного токсина – 87,5%.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках федерального проекта «САНИТАРНЫЙ ЩИТ СТРАНЫ – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» по мероприятию «Разработка новых тестов для диагностики инфекций за 60 минут».

Financial support

The work was carried out within the framework of the federal project “SANITARY SHIELD of the COUNTRY – safety for health (prevention, detection, response)” for the event “Development of new tests for the diagnosis of infections in 60 minutes”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Попова АЮ, Носков АК, Ежлова ЕБ, Кругликов ВД, Монахова ЕВ, Чемисова ОС, и др. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;1:76-88. / Popova AYU, Noskov AK, Ezhlova EB, Kruglikov VD, Monakhova EV, Chemisova OS, et al. Epidemiological Situation on Cholera in the Russian Federation in 2023 and Forecast for 2024. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;1:76-88. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-76-88 (In Russian).
2. WHO Global Cholera and AWD dashboard public [Electronic resource]. URL: <https://who-global-cholera-and-awd-dashboard-1-who.hub.arcgis.com/> (accessed 05.10.2024).

3. Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, Mukhopadhyay AK, Sack DA. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2020 Feb 29;38 Suppl 1:A73-A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099
4. Kanungo S, Azman AS, Ramamurthy T, Deen J, Dutta S. Cholera. *Lancet*. 2022 Apr 9;399(10333):1429-1440. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00330-0
5. Kalluri P, Naheed A, Rahman S, Ansaruzzaman M, Faruque AS, Bird M, et al. Evaluation of three rapid diagnostic tests for cholera: does the skill level of the technician matter? *Trop Med Int Health*. 2006 Jan;11(1):49-55. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01539.x
6. Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guérolé A, et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 May;10(3):476-8. DOI: 10.1128/cdli.10.3.476-478.2003
7. Wang XY, Ansaruzzaman M, Vaz R, Mondlane C, Lucas ME, von Seidlein L, et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. *BMC Infect Dis*. 2006 Feb 16;6:17. DOI: 10.1186/1471-2334-6-17
8. Sayeed MA, Islam K, Hossain M, Akter NJ, Alam MN, Sultana N, et al. Development of a new dipstick (Cholkit) for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 in acute watery diarrheal stools. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Mar 14;12(3):e0006286. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006286
9. World Health Organization (WHO) Global Task Force on Cholera Control Surveillance Laboratory Working Group. The Use of Cholera Rapid Diagnostic Tests. URL: <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2019/10/gtfcc-interim-use-of-cholera-rapid-diagnostic-tests.pdf>
10. Westphal O, Jann K. Bacterial Lipopolysaccharides Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 1965;5:83-91.
11. Mekalanos JJ, Collier RJ, Romig WR. Purification of cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypertoxinogenic mutants. *Infect Immun*. 1978 May;20(2):552-8. DOI: 10.1128/iai.20.2.552-558.1978
12. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
13. Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*. 1987 Jun 26;100(1-2):173-9. DOI: 10.1016/0022-1759(87)90187-6
14. Kimball SR, Rannels SL, Elensky MB, Jefferson LS. Quantitation of proteins by dot-immunobinding assay. A comparison of visualization methods using eukaryotic initiation factor 2 and a monospecific antibody. *J Immunol Methods*. 1988 Feb 10;106(2):217-23. DOI: 10.1016/0022-1759(88)90200-1
15. Renner SW. Immunoblotting and dot immunobinding. Emerging techniques in protein immunochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 Aug;112(8):780-6.
16. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, Гаврилова ЕМ. Теория и практика иммуноферментного анализа. Т. 33. М.: Высш. шк., 1991;174-175. / Egorov AM, Osipov AP, Dzantiev BB, Gavrilova EM. Theory and practice of enzyme immunoassay. V. 33. M.: Higher school, 1991;174-175. (In Russian).
17. Bioconjugate Techniques. ScienceDirect [Electronic resource]. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123822390/bioconjugate-techniques> (accessed: 01.10.2024).
18. Muzembo BA, Kitahara K, Ohno A, Debnath A, Okamoto K, Miyoshi SI. Cholera Rapid Diagnostic Tests for the Detection of *Vibrio cholerae* O1: An Updated Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Nov 13;11(11):2095. DOI: 10.3390/diagnostics11112095
19. Falconer J, Diaconu K, O'May F, Gummaraju A, Victor-Uadiale I, Matragrano J, et al. Cholera diagnosis in human stool and detection in water: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2022 Jul 6;17(7):e0270860. DOI: 10.1371/journal.pone.0270860
20. Dizon JJ, Fukumi H, Barua D, Valera J, Jayme F, Gomez F, et al. Studies on cholera carriers. *Bull World Health Organ*. 1967;37(5):737-43.

Информация о соавторах:

Королёва-Ушакова Анжела Григорьевна, младший 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

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

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

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хомяков Артём Евгеньевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов 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

Information about co-authors:

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

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Taras V. Fedorov, PhD in Biological Sciences, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Alexey A. Gorbatov, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Artyom E. Khomyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, MD, PhD, Chief Researcher, of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Разработка сальмонеллезной вакцины на основе слабоацелированного липополисахарида *Salmonella enterics Enteritidis*: биотехнология получения, структурные, серологические и иммуногенные характеристики препарата

О.И.Науменко¹, Б.И.Алхазова¹, С.В.Коробова¹, А.А.Мироненко¹, П.А.Стряхнин¹, Н.А.Разваляева¹, В.А.Ледов¹, В.И.Шмиголь¹, И.Ю.Курбатова¹, И.А.Казаков¹, И.В.Анкудинов¹, М.Э.Головина¹, Н.Н.Карцев², Э.А.Светоч², П.Г.Апарин¹, И.А.Дятлов²

¹ООО «ГРИТВАК», Москва, Российская Федерация;

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

Инвазивная нетифоидная сальмонеллезная болезнь является ведущей причиной смертности и заболеваемости в развивающихся странах, а *Salmonella enterica Enteritidis* – один из наиболее распространенных во всем мире штаммов нетифоидной сальмонеллы, способный вызывать летальные инвазивные и системные инфекции. В настоящее время в клинической практике отсутствуют вакцины для профилактики сальмонеллезной инфекции, вызванной *S. Enteritidis*.

Цель. Разработка технологии получения и иммунологическая оценка нетоксичного липополисахарида (ЛПС) *S. Enteritidis* для создания на его основе кандидатного вакцинного препарата против сальмонеллезной инфекции.

Материалы и методы. ЛПС получали методом фенольной экстракции, обрабатывали ферментами для удаления примесей белка и нуклеиновых кислот, далее ультрацентрифугировали. Для снижения токсичности полученного ЛПС его деацетилювали. Далее проводили физико-химическую и биологическую характеристику полученного ЛПС.

Результаты. Получен нетоксичный высокоочищенный ЛПС *S. Enteritidis*, не обладающий пирогенностью в фармакопейном тесте на кроликах. Структура и подлинность антигена подтверждены методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии. Препарат специфически распознавался сыворотками животных, содержащими антитела к фактору 9 (тивелоза) или 12 О-антигена *S. Enteritidis*. Иммунизация лабораторных животных полученным вакцинным ЛПС вызывала образование специфических антител IgM и IgG. Максимальное количество сывороточных антител достигалось после третьего введения антигена.

Заключение. Разработана технология, позволяющая получать нетоксичный высокоочищенный и иммуногенный ЛПС *S. Enteritidis* в промышленных масштабах. Это позволит создать вакцину против сальмонеллезной инфекции и сократить социально-экономический ущерб, наносимый заболеванием.

Ключевые слова: *Salmonella enterica Enteritidis*, липополисахарид, деацетилювание, масс-спектрометрия, ядерно-магнитный резонанс, высокоэффективная жидкостная хроматография, вакцина

Для цитирования: Науменко О.И., Алхазова Б.И., Коробова С.В., Мироненко А.А., Стряхнин П.А., Разваляева Н.А., Ледов В.А., Шмиголь В.И., Курбатова И.Ю., Казаков И.А., Анкудинов И.В., Головина М.Э., Карцев Н.Н., Светоч Э.А., Апарин П.Г., Дятлов И.А. Разработка сальмонеллезной вакцины на основе слабоацелированного липополисахарида *Salmonella enterics Enteritidis*: биотехнология получения, структурные, серологические и иммуногенные характеристики препарата. Бактериология. 2024; 9(4): 15–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-15-24

Development of a salmonella vaccine based on low acylated lipopolysaccharide *Salmonella enterics Enteritidis*: biotechnology process development, structural, serological and immunogenic characteristics of the preparation

O.I.Naumenko¹, B.I.Alkhazova¹, S.V.Korobova¹, A.A.Mironenko¹, P.A.Stryakhnin¹, N.A.Razvalyayeva¹, V.A.Ledov¹, V.I.Shmigol¹, I.Yu.Kurbatova¹, I.A.Kazakov¹, I.V.Ankudinov¹, M.E.Golovina¹, N.N.Kartsev², E.A.Svetoch², P.G.Aparin¹, I.A.Dyatlov²

Для корреспонденции:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, иммунолог ООО «ГРИТВАК»

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Статья поступила 15.11.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Svetlana V. Korobova, PhD in Biological Sciences, immunologist, GRITVAK LLCA

Address: 24 Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russian Federation

The article was received 15.11.2024, accepted for publication 25.12.2024

¹GRITVAK LLC, Moscow, Russian Federation;²The State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

Invasive none-typhoid salmonella disease is the main cause of death and morbidity in developing countries. *Salmonella enterica* *Enteritidis* is one of the most widespread strains of non-typhoid salmonella worldwide. It is cause of lethal invasive and systemic infections. Currently, there are no vaccines in clinical practice to prevent salmonella infection caused by *S. Enteritidis*.

Objective. Goals and objectives. Development of technology for the production of nontoxic lipopolysaccharide (LPS) from *S. Enteritidis* and its immunological evaluation to create a candidate vaccine preparation against salmonella infection.

Materials and methods. LPS was obtained by phenolic extraction, treated with enzymes to remove impurities of protein and nucleic acids, then ultracentrifugated. Then LPS was deacetylated to reduce its toxicity. Next, the physico-chemical and biological characteristics of the obtained LPS were carried out.

Results. Non-toxic, highly purified LPS *S. Enteritidis* was obtained. The structure and identity have been confirmed by NMR and mass spectrometry. LPS was specifically recognized by animal serums containing antibodies to factor 9 (tyvelose) or 12 of the *S. Enteritidis* O-antigen. Immunization of laboratory animals with the obtained LPS caused the induction of specific IgM and IgG antibodies. The maximum rate of serum antibodies was reached after the third administration of the antigen.

Conclusion. Technology that allows to obtain non-toxic, highly purified and immunogenic *S. Enteritidis* LPS on an industrial scale has been developed. This will make it possible to create a vaccine against *S. Enteritidis*, and reduce the socio-economic damage caused by this infection.

Key words: *Salmonella enterica* *Enteritidis*, lipopolysaccharide, deacetylation, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, high-performance liquid chromatography, vaccine

For citation: Naumenko O.I., Alkhazova B.I., Korobova S.V., Mironenko A.A., Stryakhnin P.A., Razvalyayeva N.A., Ledov V.A., Shmigol V.I., Kurbatova I.Yu., Kazakov I.A., Ankudinov I.V., Golovina M.E., Kartsev N.N., Svetoch E.A., Aparin P.G., Dyatlov I.A. Development of a salmonella vaccine based on low acylated lipopolysaccharide *Salmonella enterica* *Enteritidis*: biotechnology process development, structural, serological and immunogenic characteristics of the preparation. Bacteriology. 2024; 9(4): 15–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-15-24

Род *Salmonella* принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae* и включает граммотрицательные, не образующие спор, факультативно-анаэробные бактерии, являющиеся основным возбудителем сальмонеллезной инфекции во всем мире, передаваемым пищевым путем заражения [1]. Род *Salmonella* состоит всего из двух видов: *S. enterica* и *S. bongori* [2].

Инвазивная нетифоидная сальмонеллезная болезнь (iNTS) является ведущей причиной смертности и заболеваемости в развивающихся странах, а *S. enterica* *Enteritidis* (*S. Enteritidis*) – один из наиболее распространенных во всем мире штаммов нетифоидной сальмонеллы, способный вызывать летальные инвазивные и системные инфекции [3]. Нетифоидная *S. Enteritidis* занимает ведущее место в этиологии сальмонеллеза в России и является доминирующим серовариантом, вызывающим пищевые токсикоинфекции человека [4, 5]. Например, в 2023 г. в Москве были выявлены случаи заражения *S. Enteritidis* после употребления продукции в кафе быстрого питания [6]. В группе риска при сальмонеллезной инфекции находятся младенцы, пожилые люди и люди с ослабленным иммунитетом, которые могут заболеть после приема всего одной клетки зараженного организма [7].

В последние десятилетия отмечается рост количества антибиотико-резистентных штаммов бактерии [8], а первые случаи были выявлены еще в начале 1960-х гг. к антибиотику хлорамфениколу [9]. Поэтому вакцинация является одним из эффективных способов предотвращения распространения заболеваний, вызываемых сальмонеллами.

Первой вакциной против сальмонеллезной инфекции – брюшного тифа – являлась убитая цельноклеточная брюшнотифозная вакцина, разработанная Wright в 1897 г. [10]. Современная брюшнотифозная Vi-полисахаридная вакцина ВИАВВАК была разработана предприятием «ГРИТВАК» и внедрена в практику здравоохранения России [11]. Однако лицензированных вакцин против нетифоидных сальмонел-

лезов iNTS в настоящее время нет, несмотря на частоту и тяжесть инфекционного заболевания.

В течение XX века предпринимались неоднократные попытки получить живые аттенуированные сальмонеллезные вакцины. Однако достижение правильного баланса между иммуногенностью и безопасностью остается серьезной проблемой живых iNTS-вакцин [12]. Вследствие отсутствия в клетках нетифоидных сальмонелл дополнительных сильных иммуногенов, например капсульных антигенов, разработанные инактивированные цельноклеточные вакцины, антигенные фракции, выделенные из возбудителя, также оказались неэффективными [13].

Вместе с тем активность в области разработки вакцин против сальмонелл в последние годы существенно увеличилась. Современные разработки сальмонеллезных вакцин уделяют большее внимание использованию полисахаридов как основы вакцинных конструкций, например в препаратах на основе гликоконъюгатов.

Технология гликоконъюгации [14] представляет собой одну из наиболее передовых стратегий разработки вакцины против iNTS [15]. Примером современного варианта гликоконъюгированной вакцины является препарат на основе «утяжеленного» O-полисахарида-COPS, состоящего из части кор-ОПС (COPS) липополисахарида (ЛПС) *S. Enteritidis*, конъюгированного с белком флагеллина из гомологичного штамма [16, 17]. В настоящее время также проводятся исследования, направленные на получение везикулярных сальмонеллезных вакцин (OMV-вакцин) путем создания рекомбинантных штаммов, продуцирующих везикулы внешней мембраны клетки [18].

За патогенное действие граммотрицательных бактерий отвечают «заякоренные» во внешней мембране клеточной стенки молекулы ЛПС, представляющие собой гетерогенные макромолекулы, состоящие из трех доменов: липида А – консервативного участка молекулы ЛПС, проявляющего свойства эндотоксина; центрального олигосахарида (кóра),

несущего антигена, общие для ЛПС большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и высоковариабельного дистального участка, определяющего бактериальный серовар – О-специфического полисахарида (О-антигена), построенного из повторяющихся олигосахаридных звеньев [19]. Таким образом, ЛПС остается основой для создания вакцин против граммотрицательной инфекции.

В предыдущих исследованиях нами была открыта возможность получения клинически применимого ЛПС за счет рационального снижения эндотоксичности (детоксикации) молекулы ЛПС без снижения иммуногенности, т.е. возможности индуцировать выработку О-специфических антител [20]. Получение клинически применимого ЛПС может быть реализовано за счет детоксикации молекулы ЛПС путем О-дезацелирования липида А. С другой стороны, важно сохранить иммуногенный потенциал молекулы ЛПС, т.е. возможность индуцировать выработку О-специфических антител, и для этого чрезвычайно важно, чтобы структура О-антигена оставалась неизменной.

Целью данной работы являлась разработка биотехнологического процесса получения нетоксичного слабоацилированного ЛПС *S. enteritidis* и его иммунологическая оценка для создания на его основе кандидатного вакцинного препарата против сальмонеллезной инфекции.

Материалы и методы

Бактериальный штамм и условия культивирования. Типовые штаммы *S. Enteritidis* AV11 были выращены до поздней логарифмической фазы в жидкой питательной минеральной среде в течение 12 ч и сконцентрированы до 1 л.

Выделение и деградация нативного ЛПС. Из полученного концентрата центрифугированием отделяли бактериальные клетки, из которых были выделены ЛПС по методу фенольной экстракции, предложенной Westphal [21], с последующим диализом и лиофилизацией. Полученный высушенный препарат растворяли в 0,05 М буфере TRIS при pH 7,2, содержащем по 0,01% CaCl_2 и MgCl_2 . К полученному раствору добавляли РНКазу (Sigma-Aldrich) и ДНКазу (Sigma-Aldrich) и перемешивали при 37°C в течение 16 ч. Реакционную смесь обрабатывали протеиназой К (Sigma-Aldrich) в течение 2 ч при 55°C. Очищенные ЛПС *S. Enteritidis* были подвергнуты препаративному ультрацентрифугированию (29 000 об./мин) в течение 3 ч и лиофилизированы.

Частичное дезацелирование ЛПС. Полученный сухой ЛПС растворяли в 8,3%-м водном растворе аммиака и перемешивали при 30°C в течение 8 ч, а затем охлаждали до 5–10°C. Полученный раствор нейтрализовали добавлением уксусной кислоты, высаживали в спирт, а осадок отделяли центрифугированием с повторной промывкой этанолом. Полученный осадок, содержащий конечный продукт – дезацелированный ЛПС (дЛПС), растворяли в воде и лиофилизировали.

SDS-PAGE-электрофорез. Проводили на 12%-м акриламидном геле с додецилсульфатом натрия по методу Laemmli [22] с использованием системы электрофореза Bio-Rad Mini-Protean. Гели окрашивали азотнокислым серебром.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Проводили на хроматографе Agilent 1260 Infinity

(Agilent, США) с рефрактометрическим детектором с использованием колонки TOSOH BIOSCIENCE TSK-GEL G3000PW, 7,5 mm ID x 30,0 cm L (Sigma-Aldrich, США) в 0,2 М PBS-буфере с pH 7,4 и концентрацией образцов дЛПС *S. Enteritidis* – 50 мкг/мл и 500 мкг/мл (после гидролиза). Калибровку колонки проводили с помощью декстранов T250, T70, T40, T10 и T5 с молекулярными массами 250, 70, 40, 10 и 5 кДа соответственно.

Масс-спектрометрия. Масс-спектры высокого разрешения образцов липида А с ионизацией электрораспылением измеряли в режиме отрицательных ионов с использованием прибора micrOTOF II (Bruker Daltonics).

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Перед съемкой спектров ЯМР образцы лиофилизировали из 99,9% D_2O и исследовали в виде раствора в 99,95% D_2O . Спектр ЯМР регистрировали на спектрометре Avance II 600 MHz (Bruker, Германия) при 50°C с использованием 3-триметилсилилпропаноата натрия-2,2,3,3-d 4 (δ Н 0) в качестве эталона для калибровки.

Определение пирогенности. Проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIV, ОФС. 1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [23]. Исследуемые препараты разводили в апиrogenном 0,9%-м растворе хлорида натрия до концентрации 0,025 мкг/мл и вводили внутривенно трем кроликам породы шиншилла массой 2–3 кг (питомник лабораторных животных «Андреевка») из расчета 1 мл препарата на 1 кг массы животного. Ректальную температуру кроликов измеряли трижды в течение 3 мин с интервалом в 1 ч.

Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения специфической активности дЛПС *S. Enteritidis*. дЛПС *S. Enteritidis* сорбировали в 96-луночной планшете (Greiner, США) в последовательных разведениях от 50 до 0,4 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После инкубации (5 ч при 37°C) и отмывки (3 раза ФСБ/ 0,05% (v/v) Твин-20 (Sigma-Aldrich, США) – ФСБ-Т) в лунки вносили полиспецифическую сыворотку кролика, содержащую антитела к фактору 9 или 12 О-антигену *S. Enteritidis* (СПБНИИВС, Россия) в рабочем разведении в ФСБ-Т/ 1% (m/v) бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 1 ч при 37°C. Планшет отмывали 3 раза ФСБ-Т и вносили конъюгат козьих антител против IgG кролика, меченных пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ-Т/ 1% (m/v) БСА, инкубировали 1 ч при 37°C. Планшет отмывали 3 раза ФСБ-Т, вносили субстрат тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в лунки 5%-й раствор серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) измеряли на фотометре iMark (Biorad, США) при длине волны 450 нм.

Иммуногенность дЛПС. дЛПС *S. Enteritidis* вводили внутривенно (в/в) мышам (СВА × С57В1/6)F1 трехкратно с интервалом в 14 дней в разовой иммунизирующей дозе 50 мкг. Сыворотки для ИФА отбирали на 14-е сутки после каждого введения препарата из ретроорбитального синуса. Антиген-нативный ЛПС *S. Enteritidis* сорбировали в карбонат-бикарбонатном буфере в лунках 96-луночного планшета в концентрации 40 мкг/мл в течение 2 ч при 37°C. После инкубации и отмывки (3 раза ФСБ-Т) в лунки вносили ФСБ/ 1% (m/v) БСА и инкубировали ночь при 4°C. Планшет отмывали 3 раза ФСБ-Т и вносили сыворотки с определяемыми

антителами в разведении 1:100 в ФСБ-Т/ 1% (m/v) БСА и титровали с шагом понижения концентрации в 2 раза. Инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки (3 раза ФСБ-Т) в лунки вносили конъюгаты козьих антител против IgG, или IgM, или IgA мыши с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении в ФСБ/ 1% (m/v) БСА и инкубировали 1 ч при 37°C. После удаления конъюгатов и отмывки (3 раза ФСБ-Т) в лунки вносили субстрат ТМБ и инкубировали 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали, внося в лунки стоп-реагент для ТМБ (10%-й раствор серной кислоты). Колориметрические измерения ОП проводили на фотометре iMark при двух длинах волн: 450 и 630 нм. Результаты представляли в виде среднего геометрического конечных титров ± стандартное отклонение.

Результаты исследования

Разработан полный биотехнологический процесс получения кандидатного сальмонеллезного вакцинного препарата на основе низкотоксичного ЛПС *S. Enteritidis*. Основные стадии пилотного процесса представлены на рис. 1. Технологический процесс разработан в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики и включает целый ряд точек внутрипроцессного контроля (наличие примесей белков и нуклеиновых кислот, пирогенность, подлинность – ЯМР-спектроскопия).

Выделение, очистка и детоксикация ЛПС из биомассы *S. Enteritidis*. Методом фенольной экстракции, предложенной Westphal, из сконцентрированных до 1 л клеточных культур *S. Enteritidis* AV116, выращенных в минеральной среде М9 в течение 12 ч, были выделены ЛПС. Полученные ЛПС *S. Enteritidis* были обработаны ДНКазой и РНКазой для очистки от примеси нуклеиновых кислот, а затем протеиназой К для удаления примесных белков. Количество примесей нуклеиновых кислот и белков в ЛПС *S. Enteritidis* составило не более 1% (примеси нуклеиновых кислот – 0,68%; примеси белков – 0,8%).

Очищенный ЛПС *S. Enteritidis* был подвергнут препаративному ультрацентрифугированию (29 000 об./мин) в течение 3 ч. По данным SDS-электрофореза после лиофилизации супернатанта с высоким выходом были получены ЛПС *S. Enteritidis*, содержащие в мажоре длинноцепные О-полисахариды (рис. 2), т.е. являющиеся высокомолекулярными.

Полученный ЛПС *S. Enteritidis* был подвергнут мягкому щелочному гидролизу с целью детоксикации (деацелирования) по липиду А [24].

Физико-химическая характеристика ЛПС *S. Enteritidis*.

Физико-химическая характеристика полученного дЛПС проводилась с целью подтверждения сохранности его структуры после деацелирования, а также подлинности.

Спектр ¹H ЯМР 3-ацелированного О-полисахарида *S. Enteritidis* AV116 показал 4 основных аномерных сигнала при 4,89–5,27 м.д., сложную кольцевую область, 2 сигнала при 2,05 и 1,81 м.д. и 2 синглета, соответствующие Н-6 6-дезоксисахаров. Полученные протонные химические сдвиги хорошо согласуются с ранее опубликованными данными ЯМР капсульного полисахарида *S. Enteritidis* (рис. 3) [25].

По результатам проведенных исследований ЯМР-спектроскопии образец ЛПС *S. Enteritidis* AV116 содержит

тетрасахаридное повторяющееся О-звено. Отсутствие пиков Glc2Ac в слабом поле при 5,0 ppm (аномер глюкозы) и 2,0 (ацетатный заместитель) свидетельствует, что ЛПС *S. Enteritidis* AV116 имеет полностью негликозилированную регулярную полисахаридную цепь тетрасахарида, идентичную другому штамму той же серогруппы *S. Pullorum* 11 (рис. 4).

Полученные сигналы в спектрах ЛПС были по существу идентичны сигналам в спектрах исходного ОПС, указывая на то, что деацелирование не изменяло структуру повторяющегося звена О-полисахарида, а значит, мы достигли значительного снижения эндотоксичности (рис. 5) [24].

Структуру липида А детоксицированных ЛПС *S. Enteritidis* оценивали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в режиме отрицательных ионов. Согласно проведенному анализу, препарат содержал в основном триацильные производные липида А, о чем свидетельствует пик при m/z 1053,67, принадлежащий липиду А из ЛПС *S. Enteritidis*, содержащему одну лауроильную группу и две 3-гидроксимиристоильные группы (рис. 6).

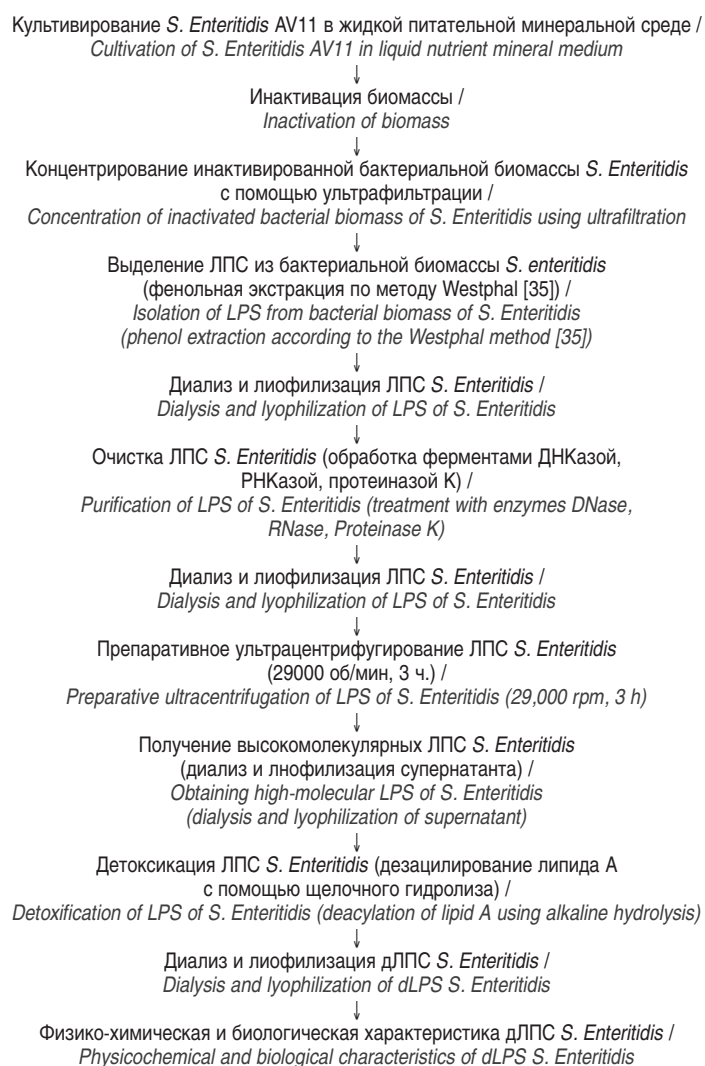


Рис. 1. Схема стадий биотехнологического процесса выделения и очистки дЛПС из бактериальной биомассы *S. Enteritidis*.
Fig. 1. A scheme of the biotechnological process stages for isolation and purification of LPS from the bacterial biomass of *S. enteritidis*.

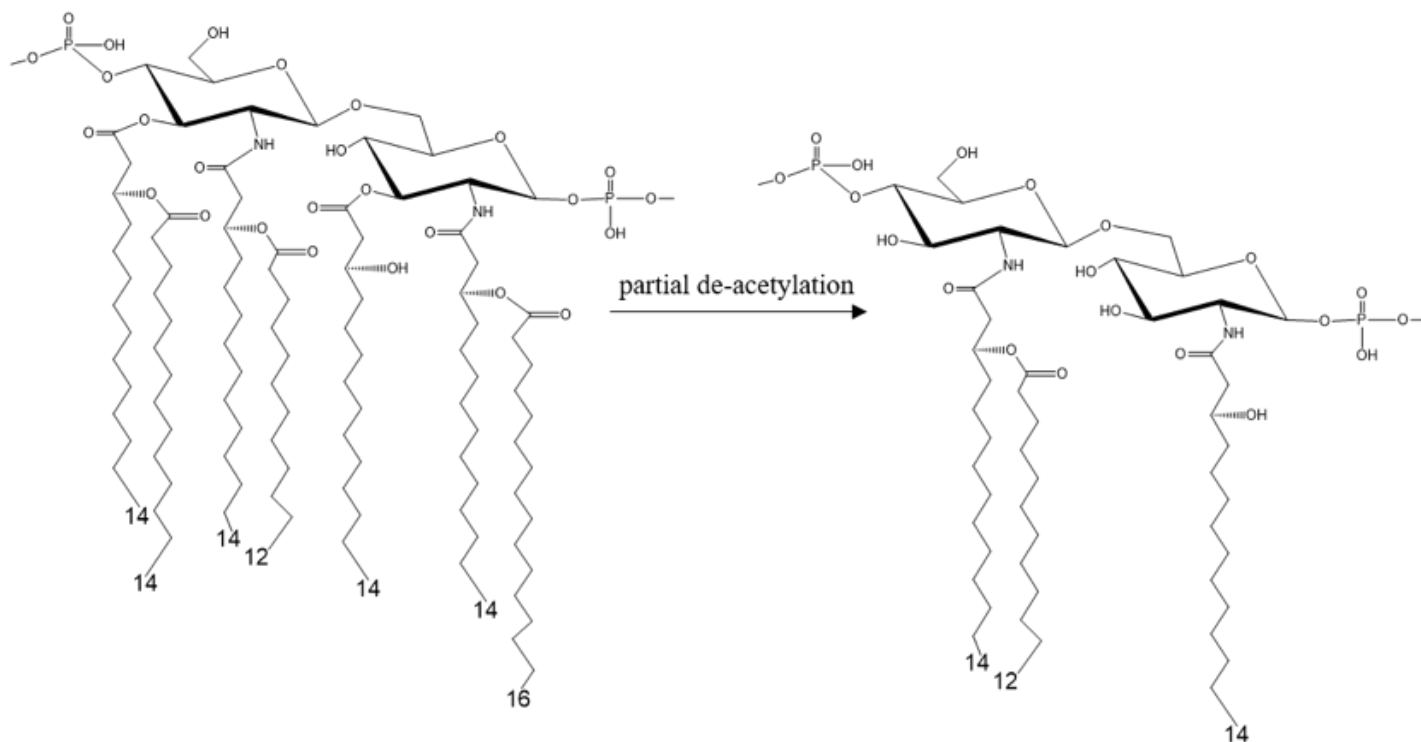


Рис. 5. Схема частичного дезацелирования липида А из ЛПС *S. Enteritidis* AV116, в результате которого отщепляются 4 жирные кислоты.

Fig. 5. A scheme of lipid A partial acylation from LPS *S. Enteritidis* F M 116, as a result of which 4 fatty acids are cleaved off.

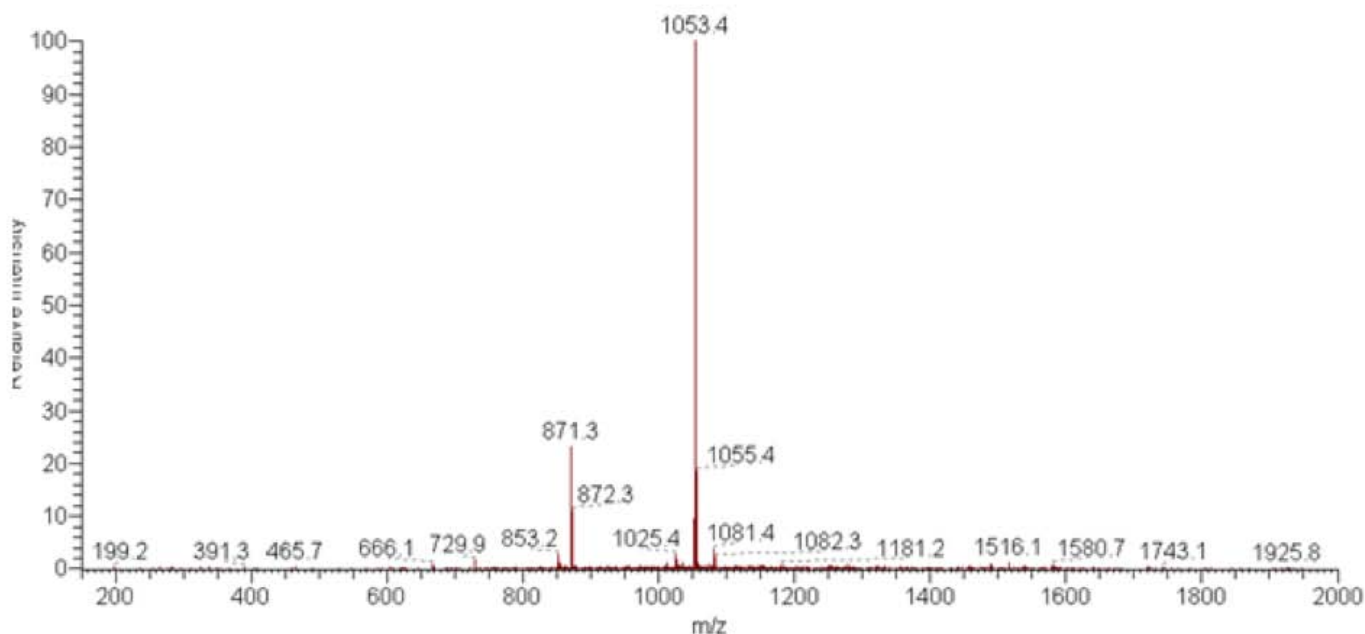


Рис. 6. Масс-спектр липида А, полученного из дЛПС *S. Enteritidis* AV116. m/z 871 соответствует дезацелированному липиду А; m/z 1053 – триацелированному липиду А.

Fig. 6. Mass spectrum of lipid A obtained from *S. Enteritidis* AV116 dLPS. m/z 871 corresponds to diacylated lipid A; m/z 1053 corresponds to triacylated lipid A.

введения ЛПС приводили к увеличению титра антител, максимум достигался после третьего введения. Титр специфических антител IgG составил 10 ± 5 после первого введения, 91 ± 18 после второго введения и 1244 ± 249 после третьего введения. Титр специфических антител IgM составил 38 ± 8 после первого введения, 200 ± 23 после второго введения и 1689 ± 338 после третьего введения. Специфические антитела IgA не определялись во всех группах. Как видно из полученных данных, нет значительной разницы в титрах спе-

цифических антител IgG и IgM во всех группах (рис. 10). Таким образом, модифицированный ЛПС имеет высокую иммунологическую активность.

Обсуждение

ЛПС являются консервативными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами грамотрицательных энтеробактерий, и их можно рассматривать в качестве целевых

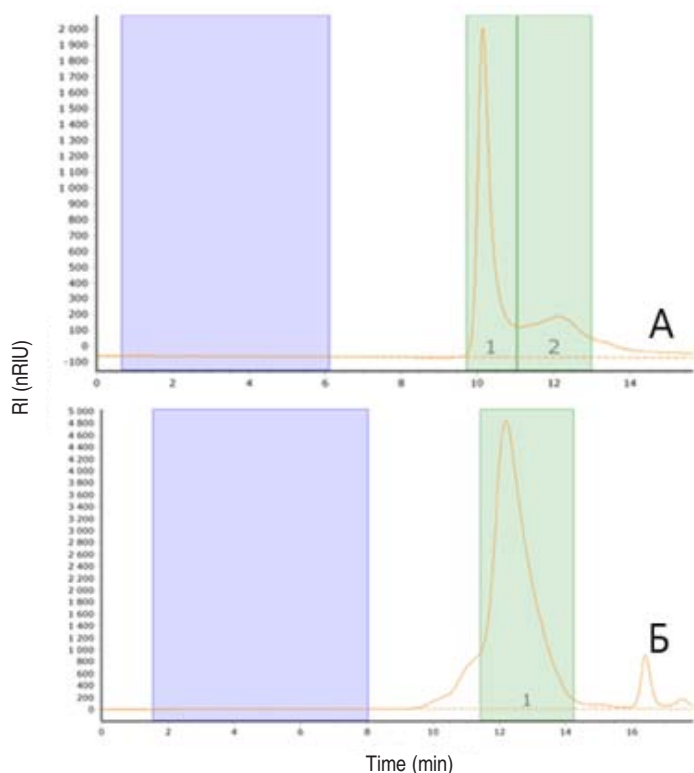


Рис. 7. Результаты ВЭЖХ дЛПС (А) и О-полисахарида (Б) *S. Enteritidis* в 0,2 М PBS-буфере с pH 7,4.
 Fig. 7. Results of HPLC of dLPS(A) and OPS (Б) of *S. Enteritidis* in 0.2 M PBS buffer with pH 7.4.

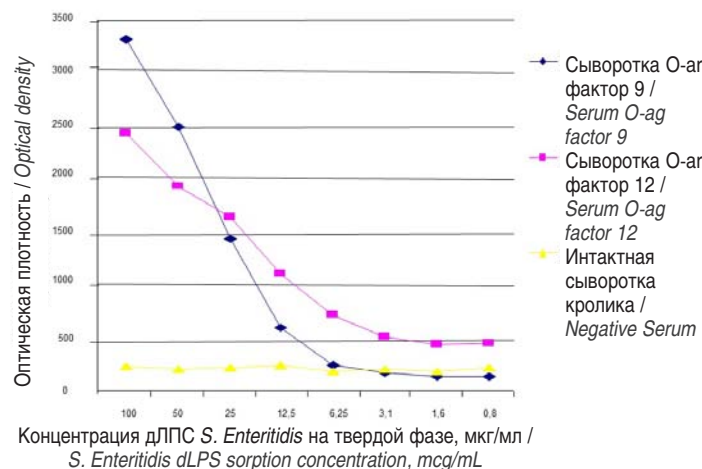


Рис. 9. Сероспецифическая активность дЛПС *S. Enteritidis*.
 Fig. 9. Sera activity of *S. Enteritidis* dLPS.

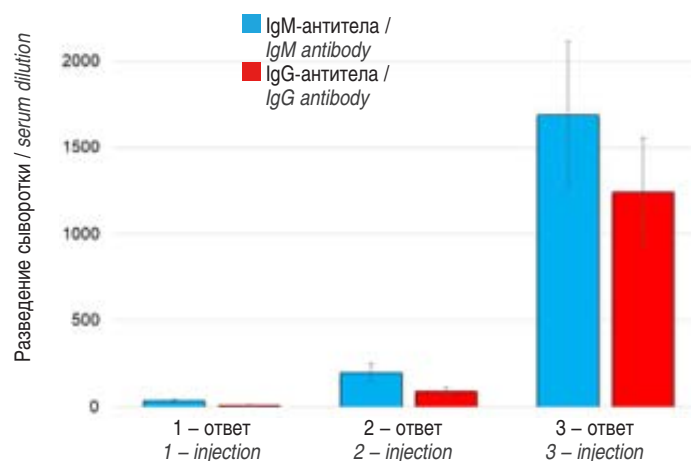


Рис. 10. Развитие специфического IgG- и IgM-ответа у мышей F1 (CBA × C57Bl/6)F1, иммунизированных дЛПС *S. Enteritidis*. Результаты представлены в виде разведения сывороток.
 Fig. 10. Development of a specific IgG and IgM response in F1 (CBA × C57Bl/6)F1 mice immunized with dLPS from *S. Enteritidis*. The results are presented in the form of sera dilution.

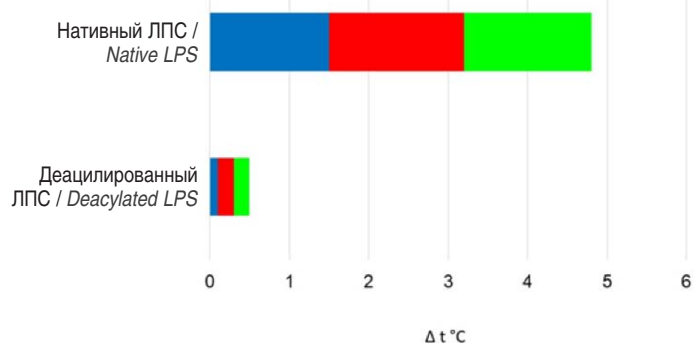


Рис. 8. Характеристика пирогенности нативного и деацелированного ЛПС *S. Enteritidis*. Столбики разных цветов отражают пирогенный ответ каждого из трех кроликов.
 Fig. 8. Pyrogenicity characteristics of the native and deacylated *S. Enteritidis* LPS. Blocks of different colours represent individual febrile response of each of three rabbits.

протективных антигенов при разработке вакцин против различных заболеваний, обусловленных возбудителями, относящимися к данной группе энтеробактерий. Гуморальный иммунный ответ, направленный к экспрессированному на ЛПС главному протективному соматическому О-антигену сальмонелл, определяет специфичность протективного иммунитета против сальмонеллезной инфекции и играет определяющую роль в формировании надежной защиты от сальмонелл. Нативный ЛПС вследствие входящего в его молекулу домена липида А является токсичным, пирогенным веществом, непригодным для приготовления вакцинных препаратов. Получение клинически применимого нетоксичного ЛПС может быть реализовано за счет детоксикации молекулы ЛПС путем О-деацелирования липида А.

Нами была разработана технология, позволяющая получить ЛПС из *S. Enteritidis* промышленного масштаба и снизить его эндотоксичность путем щелочного деацелирования ЛПС. Методами ЯМР и масс-спектрометрии были подтверждены сохранность структуры ЛПС *S. Enteritidis* и О-деацелирование липида А соответственно. Снижение эндотоксичности было подтверждено также в тесте пирогенности на кроликах. Сохранность антигенных детерминат была показана по распознаванию ЛПС *S. Enteritidis* моноспецифическими сыворотками к фактору 9 и 12 О-антигена *S. Enteritidis*.

Поскольку полученный дЛПС планируется использовать в качестве вакцинного препарата, нами было проведено исследование его иммуногенности. Антитела являются ключевым компонентом протективного иммунного ответа против *Salmonella*. Эффективность поствакцинального иммунного ответа зависит от полиспецифического иммунного ответа, т.е. активации образования различных классов и изотипов специфических антител, которые задействованы в разнообразных механизмах противобактериальной (сальмонел-

лезной) иммунной защиты. Профиль изотипа влияет на связывание антител с Fc-рецепторами и на эффективность активации комплемента. Это, в свою очередь, оказывает влияние на опсонифагоцитоз и на усиление внутриклеточных антибактериальных механизмов фагоцитов. В исследованиях на мышах было обнаружено, что поликлональные и моноклональные IgM к полисахаридным антигенам сальмонеллы обладают высокой защитной способностью, а в некоторых случаях и большей, чем IgG [28]. Проведенные нами исследования показали, что длПЭС *S. Enteritidis* вызывает образование специфических как IgG-, так и IgM-антител в примерно одинаковых титрах. Максимальные значения титров антител достигались после третьего введения.

Препарат низкоэндоотоксичного триацильного длПЭС, включающего длинные LC (long chain) O-полисахаридные цепи, обладает более высоким профилем безопасности, так как включает преимущественно триацильные формы ЛПС по сравнению с везикулярными сальмонеллезными вакцинами, в которых используется генетически детоксицированный пентаацильный ЛПС [29]. Другим проблемным моментом именно сальмонеллезных везикулярных вакцин является снижение длины O-полисахаридных цепей в препарате и, соответственно, риск утраты иммуногенности [30]. Разработанная технология получения препарата длПЭС обеспечивает внутривакцинационный контроль содержания высокомолекулярных длинноцепных форм длПЭС и, таким образом, контроль иммуногенности.

Современные исследования уделяют важное внимание исследованию тонкой химической структуры и нативности O-антигена *S. Enteritidis*, включая элементы молекулярного моделирования [31]. длПЭС содержит большой набор неалтерированных антигенных детерминант, включая полезные перекрестно реагирующие со всеми серотипами сальмонелл антигенные детерминанты кора типа R2B, в отличие от фрагментов ЛПС, таких как O-полисахарид и даже COPS, используемых для получения конъюгированных белково-полисахаридных сальмонеллезных вакцин. Таким образом, целый ряд оригинальных характеристик длПЭС *S. Enteritidis* свидетельствуют о перспективности его дальнейшего изучения и разработки.

Заключение

Разработка вакцины против *S. Enteritidis* может привести к существенному снижению заболеваемости прежде всего у тех групп лиц, которые проживают вблизи или трудятся на животноводческих фермах или вовлечены в агропроизводство, сотрудников пищевой промышленности, а также лиц, проживающих в эндемичных по данному возбудителю регионах, которые могут инфицироваться при употреблении зараженных яиц.

Разработанная нами технология получения низкотоксичных и иммуногенных длПЭС *S. enteritidis* позволит создать вакцину против этого возбудителя и сократить социально-экономический ущерб, вызываемый этой инфекцией.

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

1. Grimont AD. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. 2007;9.
2. Yue M, Liu D, Li X, Jin S, Hu X, Zhao X, et al. Epidemiology, Serotype and Resistance of *Salmonella* Isolates from a Children's Hospital in Hangzhou, Zhejiang, China, 2006–2021. *Infect Drug Resist*. 2022 Aug 22;15:4735–4748. DOI: 10.2147/IDR.S374658
3. Huo CX, Dhara D, Baihan SM, Tahmasebi Nick S, Tan Z, Simon R, et al. Synthetic and immunological studies of *Salmonella Enteritidis* O-antigen tetrasaccharides as potential anti-*Salmonella* vaccines. *Chem Commun (Camb)*. 2019 Apr 11;55(31):4519–4522. DOI: 10.1039/c8cc08622b
4. Percival SL, Williams DW. Chapter Ten – *Salmonella*. *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition) Microbiological Aspects and Risks*. UK, Academic Press. 2014;209–222.
5. Шубин ФН, Раков АВ, Кузнецова НА, Якубич ТВ, Снеткова ИП. Формирование заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванным *Salmonella Enteritidis*, в районах с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;1:61–67. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-61-67
6. Available at: rospotrebnadzor.ru/about/info/news_region/news_details_region.php?ELEMENT_ID=26055&phrase_id=5177607
7. PUNCHIHEWAGE-Don AJ, Hawkins J, Adnan AM, Hashem F, Parveen S. The outbreaks and prevalence of antimicrobial resistant *Salmonella* in poultry in the United States: An overview. *Heliyon*. 2022 Nov 12;8(11):e11571. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11571
8. Yoke-Kqueen C, Learn-Han L, Noorzaleha AS, Son R, Sabrina S, Jiun-Horng S, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Mar;46(3):318–24. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02311.x
9. Montville T, Matthews K. *Food Microbiology: An Introduction*. 2nd ed. Washington, USA, ASM Press, 2008.
10. Гремякова ТА, Фурсова НК, Степанов АВ. Вакцинация против брюшного тифа: результаты и перспективы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1997;6:11–16.
11. Лобзин ЮВ, Львов ВЛ, Каира АН, Маркина АА, Елкина СИ, Анкудинов ИВ, и др. Эпидемиологические особенности и иммунопрофилактика брюшного тифа (материал для подготовки лекции). *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020;9(2):106–114. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-106-114
12. Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, et al. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3457–67. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3457-3467.2002
13. Карлухин ГИ, Шапиро НИ, Андриевская РА. Химические вакцины для профилактики кишечных инфекций: научное издание. Л.: Медицина, 1979.
14. Costantino P, Rappuoli R, Berti F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. *Expert Opin Drug Discov*. 2011 Oct;6(10):1045–66. DOI: 10.1517/17460441.2011.609554
15. Simon R, Levine MM. Glycoconjugate vaccine strategies for protection against invasive *Salmonella* infections. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Apr;8(4):494–8. DOI: 10.4161/hv.19158

16. Simon R, Tennant SM, Wang JY, Schmidlein PJ, Lees A, Ernst RK, et al. *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* core O polysaccharide conjugated to H:g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with *S. enteritidis*. *Infect Immun*. 2011 Oct;79(10):4240-9. DOI: 10.1128/IAI.05484-11
17. Nasrin S, Fuche FJ, Sears KT, Jones JA, Levine MM, Simon R, et al. Refinement of a Live Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Newport Vaccine with Improved Safety. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jan 16;9(1):57. DOI: 10.3390/vaccines9010057
18. Lei EK, Azmat A, Henry KA, Hussack G. Outer membrane vesicles as a platform for the discovery of antibodies to bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2024 Feb 24;108(1):232. DOI: 10.1007/s00253-024-13033-5
19. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*. 2011 Nov;9(6):263-77. DOI: 10.1016/j.tmaid.2011.11.001
20. Dyatlov IA, Svetoch EA, Mironenko AA, Eruslanov BV, Firstova VV, Fursova NK, et al. Molecular Lipopolysaccharide Di-Vaccine Protects from Shiga-Toxin Producing Epidemic Strains of *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4. *Vaccines (Basel)*. 2022 Nov 1;10(11):1854. DOI: 10.3390/vaccines10111854
21. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. *Meth Carbohydr Chem*. 1965;5:83-91.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0
23. Пирогенность. ОФС.1.2.4.0005.15. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Т. 1. М.: Мин. Здрав. РФ. 2018;1227-1228.
24. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019 Feb 14;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
25. Snyder DS, Gibson D, Heiss C, Kay W, Azadi P. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella Enteritidis*. *Carbohydr Res*. 2006 Oct 16;341(14):2388-97. DOI: 10.1016/j.carres.2006.06.010
26. Brooks BW, Perry MB, Lutze-Wallace CL, Maclean LL. Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Vet Microbiol*. 2008 Jan 25;126(4):334-44. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.022
27. Kusumoto S, Fukase K, Fukase Y, Kataoka M, Yoshizaki H, Sato K, et al. Structural basis for endotoxic and antagonistic activities: investigation with novel synthetic lipid A analogs. *J Endotoxin Res*. 2003;9(6):361-6. DOI: 10.1179/096805103225002737
28. Beal RK, Smith AL. Antibody response to *Salmonella*: its induction and role in protection against avian enteric salmonellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Oct;5(5):873-81. DOI: 10.1586/14787210.5.5.873
29. Rossi O, Caboni M, Negrea A, Necchi F, Alfini R, Micoli F, et al. Toll-Like Receptor Activation by Generalized Modules for Membrane Antigens from Lipid A Mutants of *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium* and *Enteritidis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2016 Apr 4;23(4):304-14. DOI: 10.1128/CVI.00023-16
30. De Benedetto G, Alfini R, Cescutti P, Caboni M, Lanzilao L, Necchi F, et al. Characterization of O-antigen delivered by Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA) vaccine candidates against nontyphoidal *Salmonella*. *Vaccine*. 2017 Jan 11;35(3):419-426. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.089
31. Gasperini G, Massai L, De Simone D, Raso MM, Palmieri E, Alfini R, et al. O-Antigen decorations in *Salmonella enterica* play a key role in eliciting functional immune responses against heterologous serovars in animal models. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Feb 29;14:1347813. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1347813
2. Yue M, Liu D, Li X, Jin S, Hu X, Zhao X, et al. Epidemiology, Serotype and Resistance of *Salmonella* Isolates from a Children's Hospital in Hangzhou, Zhejiang, China, 2006-2021. *Infect Drug Resist*. 2022 Aug 22;15:4735-4748. DOI: 10.2147/IDR.S374658
3. Huo CX, Dhara D, Baliban SM, Tahmasebi Nick S, Tan Z, Simon R, et al. Synthetic and immunological studies of *Salmonella Enteritidis* O-antigen tetrasaccharides as potential anti-*Salmonella* vaccines. *Chem Commun (Camb)*. 2019 Apr 11;55(31):4519-4522. DOI: 10.1039/c8cc08622b
4. Percival SL, Williams DW. Chapter Ten – *Salmonella*. *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition) Microbiological Aspects and Risks*. UK, Academic Press. 2014;209-222.
5. Shubin FN, Rakov AV, Kuznetsova NA, Yakubich TV, Snetkova IP. Formation of population morbidity with salmonellosis caused by *Salmonella Enteritidis* in regions with incomplete supply of local poultry products. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;1:61-67. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-61-67 (In Russian).
6. Available at: rospotrebнадзор.ru/about/info/news_region/news_details_region.php?ELEMENT_ID=26055&phrase_id=5177607
7. PUNCHIHewage-Don AJ, Hawkins J, Adnan AM, Hashem F, Parveen S. The outbreaks and prevalence of antimicrobial resistant *Salmonella* in poultry in the United States: An overview. *Heliyon*. 2022 Nov 12;8(11):e11571. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11571
8. Yoke-Kqueen C, Learn-Han L, Noorzaleha AS, Son R, Sabrina S, Jiun-Hong S, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Mar;46(3):318-24. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02311.x
9. Montville T, Matthews K. *Food Microbiology: An Introduction*. 2nd ed. Washington, USA, ASM Press, 2008.
10. Gremyakova TA, Fursova NK, Stepanov AV. Vaksinatziya protiv bryushnogo tifa rezul'taty i perspektivy. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*. 1997;6:11-16. (In Russian).
11. Lobzin YuV, Lvov VL, Kaira AN, Markina AA, Elkina SI, Ankudinov IV, et al. Epidemiological features and immunization against typhoid fever. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2020;9(2):106-114. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-106-114 (In Russian).
12. Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, et al. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3457-67. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3457-3467.2002
13. Karpukhin GI, Shapiro NI, Andrievskaya RA. *Khimicheskie vaksiny dlya profilaktiki kishcheynykh infektsii: nauchnoe izdanie. L.: Meditsina Publ., 1979. (In Russian).*
14. Costantino P, Rappuoli R, Berti F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. *Expert Opin Drug Discov*. 2011 Oct;6(10):1045-66. DOI: 10.1517/17460441.2011.609554
15. Simon R, Levine MM. Glycoconjugate vaccine strategies for protection against invasive *Salmonella* infections. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Apr;8(4):494-8. DOI: 10.4161/hv.19158
16. Simon R, Tennant SM, Wang JY, Schmidlein PJ, Lees A, Ernst RK, et al. *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* core O polysaccharide conjugated to H:g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with *S. enteritidis*. *Infect Immun*. 2011 Oct;79(10):4240-9. DOI: 10.1128/IAI.05484-11
17. Nasrin S, Fuche FJ, Sears KT, Jones JA, Levine MM, Simon R, et al. Refinement of a Live Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Newport Vaccine with Improved Safety. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jan 16;9(1):57. DOI: 10.3390/vaccines9010057
18. Lei EK, Azmat A, Henry KA, Hussack G. Outer membrane vesicles as a platform for the discovery of antibodies to bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2024 Feb 24;108(1):232. DOI: 10.1007/s00253-024-13033-5

References

1. Grimont AD. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. 2007;9.

19. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*. 2011 Nov;9(6):263-77. DOI: 10.1016/j.tmaid.2011.11.001
20. Dyatlov IA, Svetoch EA, Mironenko AA, Eruslanov BV, Firstova VV, Fursova NK, et al. Molecular Lipopolysaccharide Di-Vaccine Protects from Shiga-Toxin Producing Epidemic Strains of *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4. *Vaccines (Basel)*. 2022 Nov 1;10(11):1854. DOI: 10.3390/vaccines10111854
21. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. *Meth Carbohydr Chem*. 1965;5:83-91.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0
23. Pirogenost'. OFS.1.2.4.0005.15. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii, XIV izdanie. T. 1. Moscow: Min. Zdrav. RF. 2018;1227-1228. (In Russian).
24. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019 Feb 14;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
25. Snyder DS, Gibson D, Heiss C, Kay W, Azadi P. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella Enteritidis*. *Carbohydr Res*. 2006 Oct 16;341(14):2388-97. DOI: 10.1016/j.carres.2006.06.010
26. Brooks BW, Perry MB, Lutze-Wallace CL, Maclean LL. Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Vet Microbiol*. 2008 Jan 25;126(4):334-44. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.022
27. Kusumoto S, Fukase K, Fukase Y, Kataoka M, Yoshizaki H, Sato K, et al. Structural basis for endotoxic and antagonistic activities: investigation with novel synthetic lipid A analogs. *J Endotoxin Res*. 2003;9(6):361-6. DOI: 10.1179/096805103225002737
28. Beal RK, Smith AL. Antibody response to *Salmonella*: its induction and role in protection against avian enteric salmonellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Oct;5(5):873-81. DOI: 10.1586/14787210.5.5.873
29. Rossi O, Caboni M, Negrea A, Necchi F, Alfini R, Micoli F, et al. Toll-Like Receptor Activation by Generalized Modules for Membrane Antigens from Lipid A Mutants of *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium* and *Enteritidis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2016 Apr 4;23(4):304-14. DOI: 10.1128/CI.00023-16
30. De Benedetto G, Alfini R, Cescutti P, Caboni M, Lanzilao L, Necchi F, et al. Characterization of O-antigen delivered by Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMAs) vaccine candidates against nontyphoidal *Salmonella*. *Vaccine*. 2017 Jan 11;35(3):419-426. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.089
31. Gasperini G, Massai L, De Simone D, Raso MM, Palmieri E, Alfini R, et al. O-Antigen decorations in *Salmonella enterica* play a key role in eliciting functional immune responses against heterologous serovars in animal models. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Feb 29;14:1347813. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1347813
- Курбатова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, оператор участка производства №1, ООО «ГРИТВАК»
- Казаков Игорь Александрович, начальник производственного участка №1 ООО «ГРИТВАК»
- Разваляева Надежда Алексеевна, биолог-физиолог отдела контроля качества ООО «ГРИТВАК»
- Анкудинов Игорь Веналиевич, кандидат биологических наук, главный бухгалтер, ООО «ГРИТВАК»
- Ледов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, клинический директор ООО «ГРИТВАК»
- Шмиголь Владимир Игоревич, кандидат биологических наук, директор по производству ООО «ГРИТВАК»
- Головина Марина Эдуардовна, кандидат биологических наук, исполнительный директор ООО «ГРИТВАК»
- Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, генеральный директор ООО «ГРИТВАК»
- Светоч Эдуард Арсениевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии 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:

- Olesya I. Naumenko, PhD in Chemical Sciences, Chemist, Structural Analyst, GRITVAK LLC
- Biana I. Alkhazova, Operator, GRITVAK LLC
- Anna A. Mironenko, PhD in Biological Sciences, Biochemist of the Clinical Laboratory, GRITVAK LLC
- Petr A. Stryakhnin, Leading Biotechnologist, GRITVAK LLC
- Irina Yu. Kurbatova, PhD in Biological Sciences, Operator of Production Site No 1, GRITVAK LLC
- Igor A. Kazakov, Head of Production Site No 1, GRITVAK LLC
- Nadezhda A. Razvalyayeva, Biologist-Physiologist of the Quality Control Department, GRITVAK LLC
- Igor V. Ankudinov, PhD in Biological Sciences, Chief Accountant, GRITVAK LLC
- Vladimir A. Ledov, MD, PhD, clinical director, GRITVAK LLC
- Vladimir I. Shmigol, PhD in Biological Sciences, director of production, GRITVAK LLC
- Marina E. Golovina, PhD in Biological Sciences, executive director, GRITVAK LLC
- Petr G. Aparin, MD, PhD, DSc, general director, GRITVAK LLC
- Eduard A. Svetoch, DSc in Veterinary Sciences, Professor, Chief Researcher of the Department of Molecular Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, Senior Researcher of the Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Информация о соавторах:

Науменко Олеся Игоревна, кандидат химических наук, химик, структурный аналитик ООО «ГРИТВАК»

Алхазова Биана Игоревна, оператор ООО «ГРИТВАК»

Мироненко Анна Александровна, кандидат биологических наук, биохимик клинической лаборатории ООО «ГРИТВАК»

Стряхнин Пётр Алексеевич, ведущий биотехнолог, ООО «ГРИТВАК»

Получение мышинных моноклональных антител к белку BclA спор *Bacillus anthracis*

А.Г.Шевяков, В.А.Яковлева, Е.А.Панферцев, Р.И.Миронова С.Ф.Бикетов, С.С.Ветчинин

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

Особенностью сибиреязвенных захоронений является длительная персистенция спор патогена в почве. Детекция спор *Bacillus anthracis* в образцах почвы – сложная и трудоемкая задача, главным образом из-за ингибирующего действия почвенного матрикса, в частности гуминов, на реакции детектирования. Получение моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам спор открывает перспективу использования иммуномагнитных частиц (ИМЧ) для очистки спор от ингибиторов и повышения эффективности детекции.

Цель работы – получение МКА, специфичных к эпитопам белка BclA, локализованным на поверхности спор *B. anthracis*.

Разработана генно-инженерная конструкция, обеспечивающая синтез в клетках *Escherichia coli* рекомбинантного белка rBclA, который использовали для иммунизации мышей BALB/c с последующей гибридизацией клеток спленоцитов с миеломными клетками Sp2/0-Ag14, что привело к получению гибридом-продуцентов МКА к поверхностно локализованным эпитопам на белке BclA сибиреязвенных спор. Для отбора гибридом-продуцентов МКА, специфических к BclA, использовали метод предварительного инкубирования культуральных жидкостей, полученных после культивирования гибридомом, со спорами *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* и последующим иммуноблоттингом с препаратом экстракта спор *B. anthracis*. В результате получено 3 гибридомы-продуцента МКА, специфичных к поверхностно расположенным эпитопам белка BclA спор возбудителя сибирской язвы. Специфичность МКА проверили методом дот-блота со спорами *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*.

Ключевые слова: сибирская язва, моноклональные антитела, BclA

Для цитирования: Шевяков А.Г., Яковлева В.А., Панферцев Е.А., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф., Ветчинин С.С. Получение мышинных моноклональных антител к белку BclA спор *Bacillus anthracis*. Бактериология. 2024; 9(4): 25–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-25-33

Production of monoclonal antibodies against the protein BclA from *Bacillus anthracis*

A.G.Shevyakov, V.A.Yakovleva, E.A.Panfertsev, R.I.Mironova, S.F.Biketov, S.S.Vetchinin

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

Anthrax burials present a unique challenge due to the long-term preservation of the pathogen in soil. Determination of spores in soil samples is a difficult and laborious task, mainly via inhibition of detection process by soil matrix (particularly humic acid). Obtaining monoclonal antibodies (MAB) to surface antigens of spores opens up the prospect of using immunomagnetic particles (IMP) to clean spores from inhibitors and increase detection efficiency.

The aim of the work is to obtain MAB specific to epitopes of the BclA protein localized on the surface of *B. anthracis* spores. A genetically engineered construct has been developed that provides synthesis of recombinant rBclA protein in *Escherichia coli* cells. The protein was used to immunize BALB/c mice with subsequent hybridization of splenocytes with Sp2/0-Ag14 myeloma cells, which resulted in obtaining hybridoma-producing mAbs to surface-localized epitopes on the BclA protein of anthrax spores. To select hybridoma-producing mAbs specific to BclA, a method of preliminary incubation of culture fluids obtained after hybridoma cultivation with *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores and subsequent immunoblotting with a preparation of *B. anthracis* spore extract was used. As a result, 3 hybridomas-producing mAbs specific to surface-located epitopes of the BclA protein of the causative agent of anthrax were obtained. The specificity of the mAb was tested using the dot blot method with spores of *B. cereus*, *B. thuringiensis*, and *B. anthracis*.

Key words: anthrax, monoclonal antibodies, BclA

For citation: Shevyakov A.G., Yakovleva V.A., Panfertsev E.A., Mironova R.I., Biketov S.F., Vetchinin S.S. Production of monoclonal antibodies against the protein BclA from *Bacillus anthracis*. Bacteriology. 2024; 9(4): 25–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-25-33

Для корреспонденции:

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

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

E-mail: shevyakov@obolensk.org

Статья поступила 12.08.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Anton G. Shevyakov, researcher, Department of immunobiology of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

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

E-mail: shevyakov@obolensk.org

The article was received 12.08.2024, accepted for publication 25.12.2024

Сибирская язва – опасное зоонозное заболевание, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Возбудитель сибирской язвы в его споровой форме – наиболее известный агент, использованный в качестве биологического оружия (рассылка спор почтой в США, сентябрь 2001 г.) [1]. Выбор этого микроорганизма для биотерроризма обусловлен высокой летальностью заболевания, относительной простотой получения большого количества спор и легкостью их применения. Однако чаще всего заболевание сибирской язвой происходит в результате хозяйственной деятельности человека, связанной с содержанием домашних животных, среди которых может циркулировать возбудитель. По современным оценкам, ~1,8 млрд людей живут в регионах с риском заражения сибирской язвой. К ним относятся равнинные территории Евразии, Африки и Северной Америки. Согласно оценке Всемирной организации здравоохранения, в мире ежегодно регистрируется от 2000 до 20 000 случаев заражения сибирской язвой [2]. На территории Российской Федерации отмечаются спорадические вспышки сибирской язвы, с колебаниями ежегодного числа заболевших от 2 до 24. Максимум был зарегистрирован в 2016 г. – 36 случаев.

С эпидемиологической точки зрения наибольшую опасность представляют скотомогильники, биотермические ямы и места захоронения трупов сельскохозяйственных животных, павших от сибирской язвы (сибиреязвенные захоронения). Особенностью сибиреязвенных захоронений является долговременное сохранение спор патогена в почве, что может приводить к инфицированию животных и человека. Поэтому одним из важных элементов противоэпидемических мероприятий является исследование образцов почв потенциальных мест захоронений животных, павших от сибирской язвы, обнаружение неучтенных скотомогильников, сибиреязвенных почвенных очагов [3].

В настоящее время для детекции возбудителя сибирской язвы в Российской Федерации зарегистрированы три диагностических тест-системы на основе моноклональных антител (МКА): «Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ-тест-система *B. anthracis*» ФСР 2009/05485 (ФБУН ГНЦ ПМБ), «Набор реагентов для определения спор *B. anthracis* в реакции латекс-агглютинации» ФСР 2011/12159 (ФБУН ГНЦ ПМБ) и «Набор реагентов для определения возбудителей сибирской язвы и туляремии методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (Тест-система ИФЛА-2ВФ)» РЗН 2014/1468 (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Для сибиреязвенных диагностических тест-систем используют иммуноглобулины, полученные через иммунизацию лабораторных животных препаратом спор *B. anthracis*. Однако из результатов исследований состава различных препаратов спор для иммунизации, полученных *in vitro*, следует, что в них часто присутствует высокоиммуногенный белок EA1, содержащийся также в S-слое вегетативной формы бактерий [4, 5]. Поэтому специфичные к EA1 иммуноглобулины, полученные через иммунизацию спорами, могут использоваться для детекции как споровой, так и вегетативной формы *B. anthracis*, полученных *in vitro*. Некоторые авторы считают наличие EA1 в спорах из почвы сибиреязвенного захоронения маловероятным, что обуславливает интерес к

использованию антител к другим антигенным мишеням при выявлении спор в почве. Кроме указанных выше специфичных к EA1, используют антитела к сахару антрозы, присутствующему в гликопротеинах экзоспориума *B. anthracis* [6]. По данным литературы, в регионах с интенсивной иммунизацией животных вакцинами на основе антрозы отмечено появление мутантных безантрозных штаммов сибирской язвы [7], что делает актуальной разработку новых иммунохимических тест-систем, использующих антитела, специфичные для всех циркулирующих в природе штаммов *B. anthracis*, и обновление существующих методов диагностики с учетом эволюции патогена в природных условиях.

Внешняя оболочка спор *B. anthracis* (экзоспориум) состоит из паракристаллического базального слоя, образующего гексагональные структуры, и внешнего слоя, состоящего из белков-филаментов. В составе экзоспориума к настоящему времени обнаружено не менее 12 белков. Основной структурный компонент филаментов – бациллярный коллагеноподобный сибиреязвенный белок (Bacillus collagen-like protein of anthracis/BclA). Он состоит из сигнального пептида на N-концевом фрагменте, центрального коллагеноподобного домена и глобулярного C-концевого домена. Высокогликозилированный белок BclA – иммунодоминантный антиген спор [8]. Размер белка отличается у разных штаммов *B. anthracis*. Коллагеноподобный участок белка содержит повторяющиеся аминокислотные триплеты GXX (от 17 до 91 повторов), наиболее часто это (GPT)_n. Коллагеноподобные белки редко встречаются среди микроорганизмов. Описано всего несколько видов бактерий и вирусов, в которых они присутствуют. Основная функция этих белков еще не определена. Чаще всего они представлены поверхностными белками. Споры *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* также содержат похожие на BclA белки, но их структура отличается [9, 10]. В рамках исследований по получению антител к BclA, перспективных для детекции *B. anthracis*, отмечается сложность отбора подходящих клонов, вызванная перекрестной реакцией или низкой аффинностью [11]. Описано использование специфичных к BclA МКА BA21 для синтеза однодоменного фрагмента антител и получение гибридного термостабильного белка MBP-BA21 для разработки тест-систем [12]. В другой работе [13] предложено использование рекомбинантных антител ламы к BclA *B. cereus* для детекции спор с помощью xMAP-технологии. Таким образом, получение новых вариантов антител с высокой специфичностью и аффинностью является важным направлением для улучшения диагностики *B. anthracis* в природных условиях.

Цель настоящего исследования заключалась в получении МКА, специфичных к BclA спор *B. anthracis*.

Материалы и методы

Инактивированные штаммы бактерий *B. anthracis* (55, M-71, СТИ-1, 71/12), *B. cereus* 160, *B. thuringiensis* 214, *Bacillus anthracoid* 217, *Bacillus licheniformis* B-1411, споры и вегетативные клетки которых использовали в работе, получены из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболенск». Культивирование микроорганизмов проводили в соответствии с общепринятой методикой работы с возбудителем сибирской язвы [14].

Таблица 1. Материалы для получения макромолекулы
Table 1. Materials for obtaining macromolecule

Источник гена / Source of gene	<i>B. anthracis</i> СТИ-1
Прямой праймер F-BclA / Forward primer F-BclA	5'- aac ata tgt ttg acc cta atc ttg tag gac c-3'
Обратный праймер R-BclA / Reverse primer R-BclA	5'- gga agc tta gca act ttt tca ata ata atg g-3'
Экспрессионный вектор / Expression vector	pET-40b(+)
Штамм для экспрессии белка / Strain for protein expression	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)

Если не указано иное, в работе использовали химические реагенты производства SigmaAldrich (США), ThermoFisher (США) без дополнительной очистки.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка BclA

Ген *bclA* амплифицировали из геномной ДНК штамма *B. anthracis* СТИ-1 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (табл. 1).

Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в NdeI-HindIII сайты плазмидного вектора pET-40b(+) (Novagen, США) и трансформировали полученной генетической конструкцией штамм *Escherichia coli* BL21(DE3). В результате селекции на среде с канамицином получили рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET-*bclANH*.

Рекомбинантный белок BclA (rBclA) выделяли из индуцированного 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид лизата биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET-*bclANH* с помощью металло-хелатной хроматографии на сорбенте Ni HisTrap (GE, США). Очищенный из телец включения белок переводили в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Sepharose G-25 (GE, США) с целью рефолдинга. Степень чистоты оценивали с помощью полиакриламидного гель-электрофореза по Лэммли.

Для иммунизации rBclA сорбировали на гидроксиде алюминия в качестве адьюванта. Препарат готовили из расчета 100 мкг rBclA на 200 мкл готовой суспензии. Полученную суспензию подкожно вводили мышам линии BALB/c (самки в возрасте 4–6 нед.). Доза введения составляла 100 мкг на животное. Через 28 дней иммунизацию повторяли. Бустер-иммунизацию проводили на 56-й день введением внутрибрюшинно по 20 мг rBclA в 0,9%-м хлориде натрия. На 60-й день проверяли титр специфических антител в сыворотке с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) с rBclA.

Культивирование клеток

Культивирование клеток миеломы Sp2/0-Ag14 и гибридом проводили на культуральной среде RDF, состоящей из смеси 1:1 сред RPMI-1640 и DMEM/F-12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Гибридизация

Слияние миеломных клеток Sp2/0-Ag14 и спленоцитов иммунных мышей проводили по методике Nowinski [15]. В

качестве агента для слияния клеток использовали 50%-й водный раствор ПЭГ-4000 с pH 8,0. Суспензию клеток после гибридизации переносили в 96-луночные планшеты с селекционной средой и фидерным слоем перитонеальных макрофагов. Селекционная среда RDF-HAT содержала 20% фетальной телячьей сыворотки 2 мМ глутамина, 4,5 г/л глюкозы, 100 мкМ гипоксантина, 16 мкМ тимидина, 0,4 мкМ аминоптерина. Каждые 3–4 дня в планшетах проводили замену половины объема RDF-HAT-среды. Через 2 нед. RDF-HAT заменяли на RDF-HT (без добавления аминоптерина), на 21-е сутки использовали среду RDF с 20% сыворотки. Клетки гибридом-продуцентов после селекции и проверки специфичности антител клонировали методом лимитирующих разведений на культуральных планшетах с фидерным слоем перитонеальных макрофагов. Клонирование повторяли трижды. Стабильные гибридомы-продуценты замораживали в криопротективной среде и хранили в жидком азоте.

Иммуноферментный анализ

Раствор рекомбинантного белка BclA (5 мкг/мл в 0,01 М карбонатном буфере pH 9,6) вносили в лунки планшета для ИФА по 100 мкл и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. Неспецифические места связывания блокировали 5%-м раствором обезжиренного молока в течение 60 мин при температуре 37°C на шейкере. Планшеты промывали 10 мМ фосфатно-солевым буферным раствором с 0,05% полисорбат-20 (ФСБ-Т) трижды, добавляли по 100 мкл исследуемых образцов, контрольную сыворотку интактной мыши в разведении 1:1000, инкубировали в течение 60 мин. Лунки промывали трижды ФСБ-Т, добавляли по 100 мкл антимишних кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена в рабочем разведении, инкубировали 60 мин. Шестикратно отмывали лунки планшета ФСБ-Т и вносили по 100 мкл раствора пероксидазного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М раствора H₂SO₄ через 5 мин. Результат учитывали на планшетном спектрофотометре Varioskan LUX (ThermoScientific, США) при $\lambda = 450$ нм.

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Денатурирующий гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия проводили по стандартной методике Лэммли [16] за исключением модификации сэмпл-буфера: дополнительно вносили 8 М мочевины, 200 мМ периодата натрия NaIO₄. Вертикальный электрофорез образцов проводили в камере Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, США). Параметры разделения 75 В 30 мин, 150 В 60 мин.

Белок rBclA для электрофореза готовили из расчета 3 мкг в 10 мкл сэмпл-буфера, кипятили в течение 5 мин.

Суспензии спор *B. anthracis* 71/12 и *B. cereus* 160 промывали деионизованной водой центрифугированием на скорости 12 000 г в течение 5 мин дважды. Осадок ресуспендировали в 200 мкл деионизованной воды и наслаивали на 500 мкл фиколла-400 в микропробирке, центрифугировали на скорости 3000 г в течение 10 мин с отключенным тормозом. Надосадочную жидкость убирали, к осадку добавляли

100 мкл модифицированного сэмпл-буфера, перемешивали и кипятили в течение 20 мин.

Скрининг культуральной жидкости (КЖ) гибридом-производителей проводили методом иммуноблоттинга [17] в мини-блоттере Mini-Protean II (Bio-Rad, США). Предварительно проводили гель-электрофорез спорового экстракта в полиакриламидном геле без гребенки. Далее белки из полиакриламидного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) в Power Blotter Station (Invitrogen, США). Для блокирования неспецифической сорбции НЦМ инкубировали в растворе 5%-го обезжиренного молока в течение 18 ч при температуре +4°C, затем трижды промывали ФСБ-Т.

Для исключения перекрестно взаимодействующих с *B. cereus* антител КЖ гибридом-производителей истощали с помощью суспензии спор *B. cereus*. К 1 мл КЖ в разведении 1:10 добавляли 10^7 спор *B. cereus*, инкубировали 30 мин при 37°C с перемешиванием. Споры осаждали центрифугированием 8000 г 5 мин. НЦМ помещали в миниблоттер Mini-Protean II, в микрокамеры вносили по 400 мкл образцов КЖ, контрольную сыворотку интактной мыши в разведении 1:1000, отрицательный контроль, инкубировали 90 мин при 37°C при перемешивании. Затем отбирали образцы из микрокамер, промывали НЦМ в миниблоттере ФСБ-Т один раз, НМЦ извлекали из устройства и переносили в емкости, дважды промывали ФСБ-Т с перемешиванием. Далее вносили раствор пероксидазного конъюгата антимышиных иммуноглобулинов («ИМТЕК», Россия) в рабочем разведении, инкубировали в течение 60 мин при 37°C с перемешиванием. НЦМ промывали 6 раз ФСБ-Т, проявляли пероксидазным субстратом диаминобензидина.

Дот-блоттинг

Образцы спор разводили до концентрации 10^7 /мл деионизованной водой и вносили на НЦМ в устройстве Bio-Dot (Bio-Rad, США) по 100 мкл в лунку. После внесения образцов НЦМ просушивали в течение 40 мин в термостате при температуре 37°C. Неспецифические места связывания инактивировали 5%-м обезжиренным молоком, инкубируя в течение 10 ч при температуре 4°C. После трехкратной промывки ФСБ-Т вносили образцы МКА с концентрацией 1 мкг/мл, контрольную сыворотку интактной мыши в разведении 1:1000 и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C с перемешиванием. Отмывали НЦМ трижды ФСБ-Т, вносили раствор пероксидазного конъюгата антимышиных иммуноглобулинов («ИМТЕК», Россия) в рабочем разведении. Инкубировали в течение 60 мин в термостате при температуре 37°C при перемешивании. НМЦ промывали 6 раз ФСБ-Т. Реакцию проявляли с помощью пероксидазного субстрата 3,3'-диаминобензидина в течение трех минут, после НЦМ тщательно промывали деионизованной водой и высушивали.

Очистка моноклональных антител

Гибридомы-производители МКА культивировали на питательной среде RDF с 10% ФТС в культуральных флаконах до концентрации клеток 106/мл. Клетки и дебрис осаждали центрифугированием на 400 г в течение 5 мин. Белковую фракцию КЖ осаждали высаливанием сульфатом аммония 50%-го насыщения в течение 18 ч при температуре +4°C.

Полученный осадок отделяли центрифугированием на 8000 г в течение 15 мин. Осадок растворяли в 100 мМ натрий-фосфатном буферном растворе (ФБ) pH 8,6. Вносили 1 мМ PMSF, 1 мМ ЭДТА, центрифугировали при 12 000 г в течение 15 мин. Супернатант фильтровали через фильтр с порами 0,45 мкм и переводили в ФБ гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Sepharose G-25 (GE, США).

Образцы МКА в ФБ наносили на аффинную колонку с белок А сепарозой (BioToolomics, Англия) со скоростью 0,5 мл/мин. Очищенные МКА элюировали с помощью 0,1 М цитратного буферного раствора pH 3,0 с быстрым доведением pH до 7 раствором 2 М NaOH. Элюат переводили в ФСБ pH 7,4 гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Sepharose G-25. Специфическую активность очищенных МКА проверяли с помощью непрямого тИФА.

Результаты исследования и их обсуждение

На основе ORF гена *bclA* штамма *B. anthracis* СТИ-1 создана генно-инженерная конструкция, кодирующая синтез рекомбинантного белка BclA с относительной молекулярной массой 34 кДа (376 аминокислотных остатков) в штамме *E. coli* BL21(DE3). На N-концевом фрагменте rBclA удалены 20 аминокислотных остатков, представляющих собой сигнальный пептид. Очистку rBclA (содержащего His10-метку) из телец включения проводили с помощью металл-хелатной хроматографии (рис. 1) в денатурирующих условиях. После рефолдинга с помощью гель-фильтрующей хроматографии получили белок с электрофоретической чистотой не менее 95%. Нативный гликопротеин BclA на поверхности спор образует олигомерные структуры. Электрофорез без денатурации образца проявил серию бэндов в области ~100 кДа,

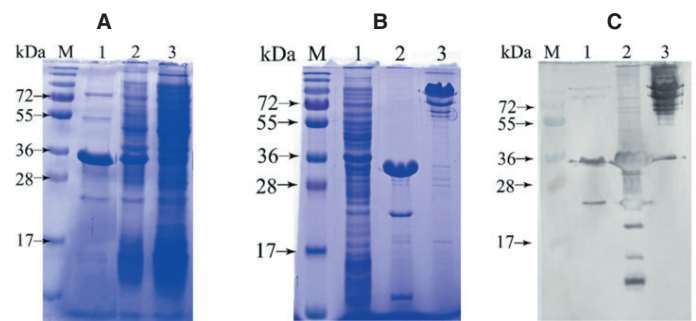


Рис. 1. А) Электрофореграмма образцов в процессе металлохелатной хроматографии, где М – маркеры молекулярного веса; 1 – фракция элюата 150 мМ имидазола; 2 – проток с хроматографической колонки; 3 – исходный раствор телец включения в 8 М мочеvine. В) Электрофореграмма готового препарата rBclA, где М – маркеры молекулярного веса, 1 – УЗ-дизинтеграция клеток штамма-производителя *E. coli* B121(DE3)/pET-bclANH, 2 – готовый препарат rBclA в денатурирующих условиях, 3 – препарат белка rBclA в нативных условиях; С) иммуноблот с антителами к His-метке рекомбинантного белка BclA.

Fig. 1. A) Electrophoretic diagram showing samples during Ni-NTA chromatography, where M – molecular weight markers; 1 – eluate fraction 150 mM imidazole; 2 – flowthrough from the chromatographic column; 3 – initial cell lysate in 8 M urea. B) Electrophoretic diagram of purified rBclA protein where M – molecular weight markers, 1 – sonicated cells of *E. coli* B121(DE3)/pET-bclANH strain, 2 – purified rBclA protein in denaturing conditions, 3 – purified rBclA protein in native conditions; C) western blot with antibodies to His-tag on recombinant BclA protein.

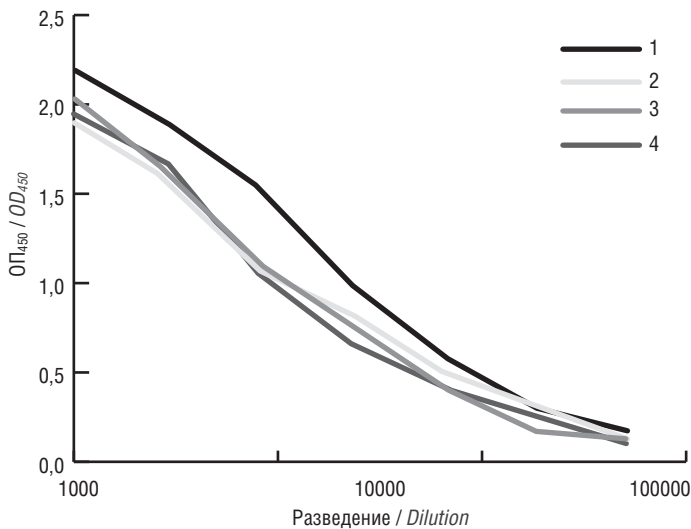


Рис. 2. График титрования иммунных сывороток мышей №№ 1–4 в непрямом тИФА с rBclA, где 1–4 – кривые титрования для экспериментальных животных. Горизонтальная пунктирная линия – OD_{450} контрольной мышинной сыворотки.

Fig. 2. Graph for immune mouse sera #1–4 in indirect ELISA with rBclA, where 1–4 are titration curves for experimental animals. The horizontal dotted line is the OD_{450} control of the naïve mouse serum.

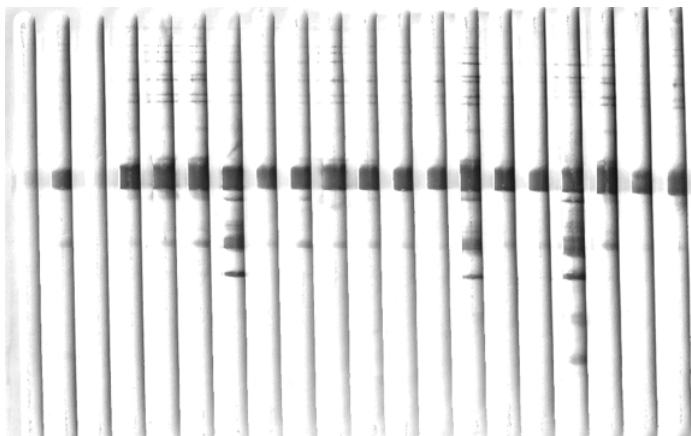


Рис. 3. Иммуноблот rBclA с образцами КЖ гибридом-продуцентов МКА в устройстве Mini-Protean II.

Fig. 3. Western blot of hybridoma cell media samples with rBclA in Mini-Protean II device.

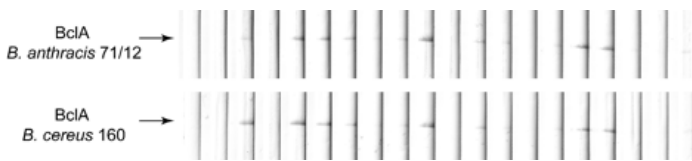


Рис. 4. Иммуноблот экстрактов спор *B. anthracis* 71/12 и *B. cereus* 160 с образцами КЖ гибридом-продуцентов МКА в устройстве Mini-Protean II.

Fig. 4. Western blot of *B. anthracis* 71/12 and *B. cereus* 160 spore extracts with hybridoma cell media samples in Mini-Protean II device.

что демонстрирует способность rBclA к полимеризации (рис. 1, В). Иммуноблоттинг с антителами, специфичными к гистидинового метке, подтвердил выделение целевого белка (рис. 1, С).

Полученный белок rBclA использовали для иммунизации мышей BALB/c. В результате курса иммунизаций достигнут титр иммунной сыворотки мышей ~1:50000 в непрямом

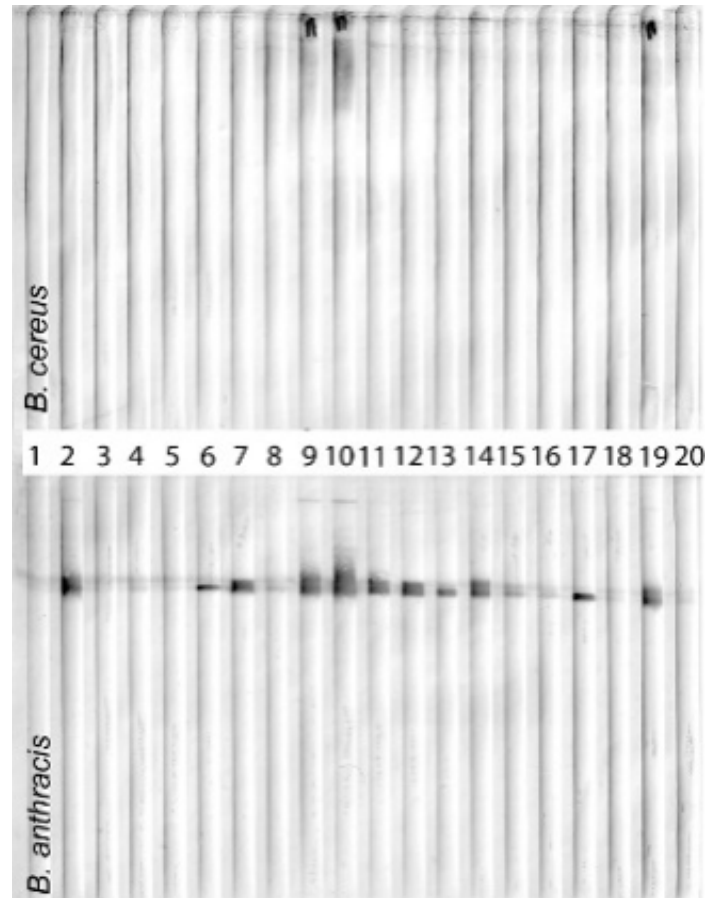


Рис. 5. Иммуноблот образцов КЖ гибридом после истощения спорами *B. cereus*. 1 – нормальная мышинная сыворотка в разведении 1:1000, 2 – специфическая сыворотка в разведении 1:1000, 3 – полная среда RDF, 4–20 – образцы КЖ гибридом.

Fig. 5. Western blot of samples of hybridoma cell media after incubation with *B. cereus* spores. 1 – naïve mouse serum in dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum in dilution 1:1000, 3 – complete RDF medium, 4–20 – hybridoma cell media samples.

тИФА (рис. 2). Все животные проявили достаточный для гибридизации спленоцитов иммунный ответ.

После гибридизации спленоцитов иммунной мыши с клетками миеломы Sp2/0-Ag14 с последующей селекцией и скринингом КЖ в ИФА против rBclA получено 347 положительно реагирующих лунок. Использование rBclA в иммуноблоттинге не позволяло однозначно определить специфичность исследуемых МКА (рис. 3). Для поиска МКА, специфично реагирующих с BclA *B. anthracis*, проводили экстракцию поверхностных антигенов спор денатурирующим буферным раствором с окислением углеводной части гликопротеина периодатом натрия. В результате отщепления сахаров молекулярный вес спорового BclA уменьшался.

Проверка КЖ гибридом в иммуноблоттинге со споровым экстрактом показала связывание МКА с BclA как *B. anthracis*, так и *B. cereus* (рис. 4). В проверяемых лунках могло находиться более одного клон-продуцента МА, что затрудняло отбор целевых гибридом.

С целью повышения эффективности отбора гибридом-продуцентов МКА, специфичных к BclA *B. anthracis*, использовали двухстадийный процесс скрининга в иммуноблоттинге. На первой стадии образцы КЖ предварительно инкубировали с суспензией спор *B. cereus* для удаления перекрест-

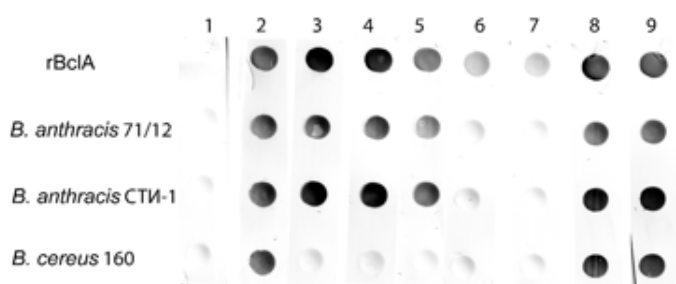


Рис. 6. Дот-блот МКА со спорами (10⁵ спор на точку) *B. anthracis* 71/12 и STI-1, *B. cereus* 160 и rBclA (100 нг на точку), где 1 – нормальная мышьяная сыворотка 1/1000, 2 – специфическая мышьяная сыворотка 1/1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, все образцы МКА в концентрации 1 мкг/мл.

Fig. 6. Dot blot with spores (10⁵ spores per point) of *B. anthracis* 71/12 and STI-1, *B. cereus* 160 and rBclA (100 ng per point), where 1 – naïve mouse serum at dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum at dilution 1:1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, concentration of all Mab samples are 1 µg/ml.

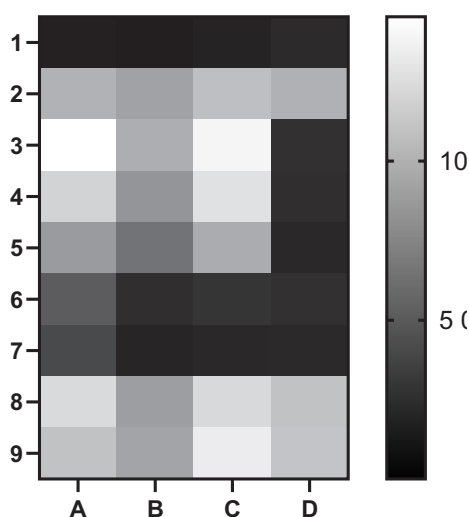


Рис. 7. Результат обработки НЦМ после дот-блота с помощью программы ImageJ и перевода значений относительной интенсивности цвета в тепловую карту в программе GraphPad Prism, где А – rBclA, В – *B. anthracis* 71/12, С – *B. anthracis* STI-1, D – *B. cereus* 160, 1 – нормальная мышьяная сыворотка 1/1000, 2 – специфическая мышьяная сыворотка 1/1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, все образцы МКА в концентрации 1 мкг/мл.

Fig. 7. Result of dot blot membrane processing using ImageJ software and converting color intensity values into thermal map in GraphPad Prism software, where A – rBclA, B – *B. anthracis* 71/12, C – *B. anthracis* STI-1, D – *B. cereus* 160, 1 – naïve mouse serum at dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum at dilution 1:1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, all Mab samples at concentration 1 µg/ml.

но взаимодействующих МКА. На второй стадии с образцами КЖ после истощения проводили иммуноблоттинг, используя споровые экстракты *B. anthracis* и *B. cereus*. Из рис. 5 видно, что можно выделить три варианта реакции КЖ гибридом. В первом варианте реакция отсутствует, что свидетельствует об отсутствии целевых МКА. Второй вариант – специфическое связывание МКА с VclA *B. anthracis*. Споровый VclA в гель-электрофорезе представлен двумя бэндами, полученные МКА реагируют только с одним или с двумя бэндами. Третий вариант – сохранение реакции с VclA *B. cereus* в виде

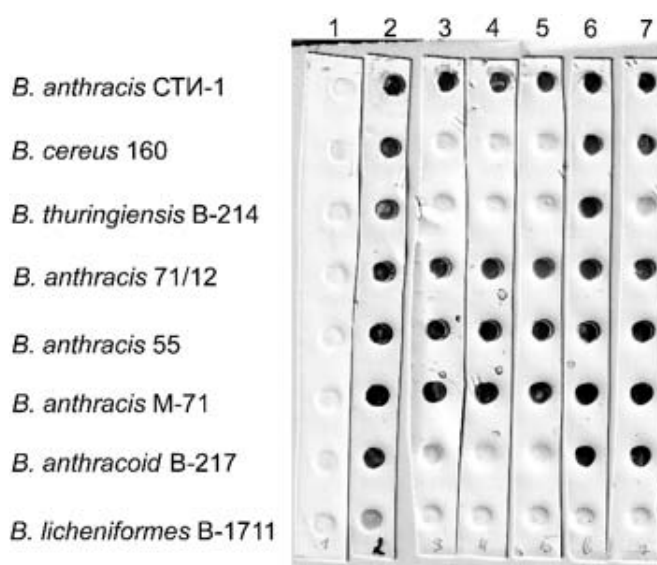


Рис. 8. Результат дот-блоттинга со спорами бацилл (10⁵ спор на точку), где 1 – нормальная мышьяная сыворотка 1/1000, 2 – специфическая мышьяная сыворотка 1/1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA4F7, 7 – BA2G8, все образцы МКА в концентрации 1 мкг/мл.

Fig. 8. The result of dot blot with bacilli spores (10⁵ spores per point), where 1 – naïve mouse serum at dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum at dilution 1:1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA4F7, 7 – BA2G8, all Mabs samples are at a concentration of 1 µg/ml.

диффузного окрашивания на уровне 150–200 кДа, что соответствует молекулярному весу гликозилированного VclA. Это явление можно объяснить не полным расщеплением сахаров в препарате экстракта спор *B. cereus*. Возможна специфичность исследованных МКА к эпипептиду, скрытому в нативной конформации белка на поверхности спор, что делало истощение неэффективным.

Для дальнейшей работы отобрали гибридомы, продуцирующие МКА, специфичные к VclA экстракта спор *B. anthracis*. Также отобрали две гибридомы-продуцента МКА, перекрестно реагирующих с *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Клетки гибридом клонировали методом предельных разведений на фидерном слое перитонеальных макрофагов в культуральных планшетах. В результате получили 3 стабильных гибридомы-продуцента МКА к VclA *B. anthracis*.

Отсутствие перекрестного взаимодействия специфичных *B. anthracis* МА с интактными спорами проверяли методом дот-блоттинга. Из рис. 6 видно, что МКА BA2G10, BA2G11, BA6F9 не имеют перекрестного взаимодействия со спорами *B. cereus* 160. МКА BA2G8 и BA4F7 взаимодействуют со спорами *B. cereus* 160, МКА BA1D8 и BA2F2 слабо взаимодействуют с rBclA и практически не связываются со спорным VclA (данные МКА взаимодействуют только с денатурированным белком).

Сканирование НЦМ после дот-блоттинга с последующей обработкой изображения в программе ImageJ и GraphPad Prism позволило сравнить интенсивность взаимодействия МКА с антигенами на количественном уровне (рис. 7). Наиболее интенсивная реакция взаимодействия со спорами отмечается для МКА BA2G11.

Дальнейшая проверка методом дот-блоттинга полученных МКА на панели нескольких штаммов *B. anthracis*, а

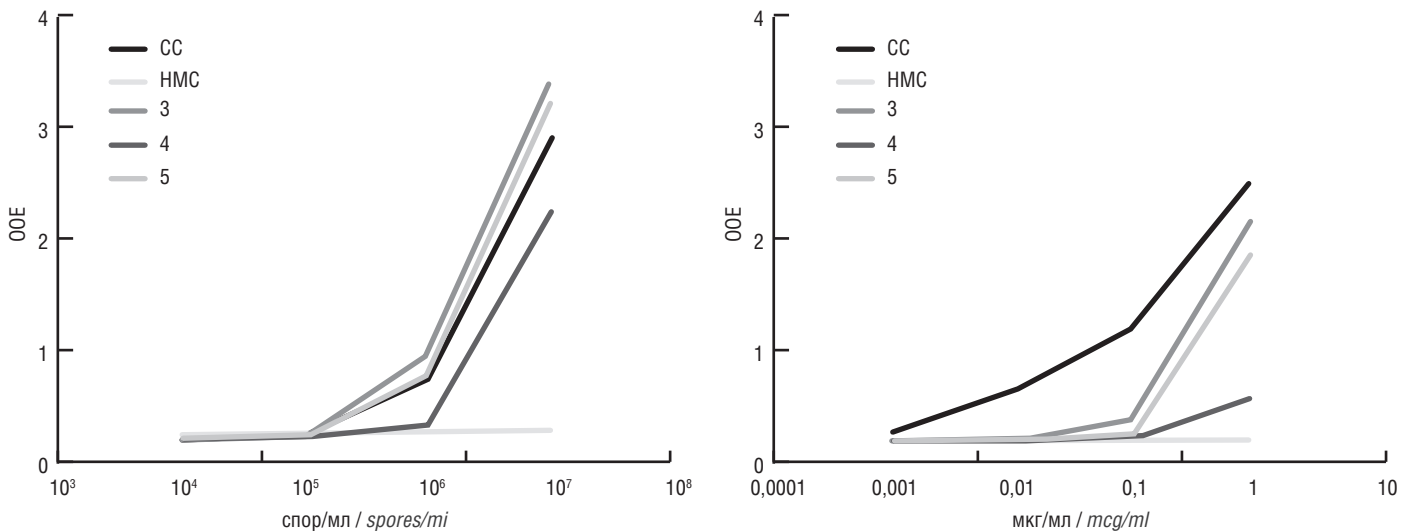


Рис. 9. Графики значений относительных оптических единиц в дот-блоттинге МКА со спорами *B. anthracis* СТИ-1 (А) и rBclA (В), где 3 – BA2G10, 4 – BA6F9, 5 – BA2G11.

Fig. 9. Graphs of relative optical units in dot blotting with *B. anthracis* STI-1 spores (A) and rBclA (B), where 3 – BA2G10, 4 – BA6F9, 5 – BA2G11.

также *B. cereus*, *B. anthracoid* и *B. thuringiensis* подтвердила их специфичность (рис. 8).

Как видно из рис. 8, МКА BA2G10, BA6F9 BA2G11 являются специфичными к белку BclA спор *B. anthracis* штаммов СТИ-1, 71/12, М-71, 55. МКА BA4F7 взаимодействуют со спорами *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. anthracoid* и *B. thuringiensis*. МКА BA2G8 взаимодействуют со спорами *B. anthracis*, *B. anthracoid* и *B. cereus*.

Для определения предела детекции спор и rBclA в дот-блоттинге на НЦМ вносили серийные разведения препаратов в объеме 100 мкл. Как видно из рис. 9, МКА BA2G10 и BA2G11 достоверно детектируют точки 10^6 спор/мл и 100 нг/мл rBclA.

Проверка МКА BA2G10, BA6F9 BA2G11 с клетками гетерологичных микроорганизмов в дот-блоттинге показала отсутствие перекрестной реакции (табл. 2).

Заключение

При совершенствовании средств обследования сибиреязвенных захоронений на наличие спор, определяющих опасность для людей и животных, следует учитывать условия, при которых может происходить формирование спор *B. anthracis*.

При разложении в глубине туши павшего животного быстро возникают анаэробные условия, в которых все вегетативные формы клеток гибнут, не пройдя процесса споруляции, который требует аэробных условий. Лишь часть клеток *B. anthracis* может оказаться в гнойно-серозных выделениях и, получив доступ к кислороду воздуха, пройти споруляцию. Таким образом, количество образующихся спор хотя и достаточно для поддержания циркуляции возбудителя за счет высокой контагиозности, но часто ниже предела обнаружения существующими методами. Поэтому для совершенствования средств обследования сибиреязвенных захоронений на наличие спор требуются методики, обеспечивающие концентрирование и сепарацию спор из общего микробиоценоза почвы. Выявление спор *B. anthracis* в образцах почвы затруднено также из-за ингибирующего действия почвенного матрикса, в частности гуминов, на реакции детектирования, поэтому желательна очистка спор от этих компонентов почвы. Разработка подобных методик подчас невозможна без специфических МКА, позволяющих связывать и извлекать споры патогена из почвенной матрицы.

В качестве мишени для получения МКА был выбран белок BclA, присутствующий в большом количестве на поверхности спор. С целью минимизации вероятности получения МКА на другие белки спор или белки вегетативной формы бактерий была применена схема с иммунизацией мышей очищенным рекомбинантным белком BclA и отбором гибридом-продуцентов МКА по способности связываться с BclA из экстракта спор сибирской язвы. В результате выбирались только положительно реагирующие с нативным белком BclA клоны гибридом-продуцентов. Так как бактерии рода *Bacilli* в большом количестве присутствуют в почве, вторым критерием отбора клонов была проверка перекрестной реакции со спорами *B. cereus* и *B. thuringiensis*.

Итогом работы является панель МКА, на основе которой возможна разработка методов сепарации и специфической детекции спор сибирской язвы в образцах окружающей среды.

Таблица 2. Результаты скрининга неспецифичной активности моноклональных антител в дот-блоттинге
 Table 2. Results of non-specific activity screening of monoclonal antibodies in dot blotting

Штаммы микроорганизмов / Strains of microorganisms	МКА Mab		
	BA2G10	BA2G11	BA6F9
<i>B. abortus</i> 19, <i>E. coli</i> JM83, <i>Salmonella</i> Paratyphi, <i>Francisella tularensis</i> 15/10, <i>Salmonella</i> Typhimurium 19585, <i>Salmonella enteritidis</i> 3-2, <i>Yersinia pestis</i> EV, <i>Legionella micdadei</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> 6, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 997, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> P7650, <i>Streptococcus pyogenes</i> CA-209, <i>Listeria monocytogenes</i> 35152	–	–	–

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Hilmas CJ and Anderson J. Anthrax. In Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 2015;387-410.
2. Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, et al. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. Nature Microbiology. 2019;4:1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
3. Шишкова НА, Тюрин ЕА, Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Опасность сибирской язвы в современных условиях. Экологический и эпидемиологический аспекты. Научград: наука, производство, общество. 2017;3:29-34.
4. Williams DD, Turnbough CL. Surface Layer Protein EA1 Is Not a Component of *Bacillus anthracis* Spores but Is a Persistent Contaminant in Spore Preparations. J of Bacteriology. 2004;186:566-569. DOI: 10.1128/jb.186.2.566-569.2004
5. Swiecki MK, Lisanby MW, Shu F, Turnbough CL Jr, Kearney JF. Monoclonal antibodies for *Bacillus anthracis* spore detection and functional analyses of spore germination and outgrowth. J Immunol. 2006 May 15;176(10):6076-84. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.6076
6. Kuehn A, Kovác P, Saksena R, Bannert N, Klee SR, Ranisch H, et al. Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. Clin Vaccine Immunol. 2009 Dec;16(12):1728-37. DOI: 10.1128/CVI.00235-09
7. Tamborini M, Bauer M, Bolz M, Maho A, Oberli MA, Werz DB, et al. Identification of an African *Bacillus anthracis* lineage that lacks expression of the spore surface-associated anthrose-containing oligosaccharide. J Bacteriol. 2011 Jul;193(14):3506-11. DOI: 10.1128/JB.00078-11
8. Rodionov AP, Artemeva EA, Melnikova LA, Kosarev MA, Ivanova SV. Features of anthrax natural foci and *Bacillus anthracis* ecology. Veterinary Science Today. 2021;151-158. DOI: 10.29326/2304-196x-2021-2-37-151-158
9. Stewart GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. Microbiol Mol Biol Rev. 2015 Dec;79(4):437-57. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15
10. Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, et al. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16014-9. DOI: 10.1073/pnas.1109419108
11. Walper S, Lee P, Anderson G, Goldman E. Selection and Characterization of Single Domain Antibodies Specific for *Bacillus anthracis* Spore Proteins. Antibodies. 2013;2:152-167. DOI: 10.3390/antib2010152
12. Buckley PE, Calm AM, Welsh H, Thompson R, Menking D, Carney J, et al. US Army Combat Capabilities Development Command Chemical Biological Center/EXCET, I. Defense Advanced Research Projects Agency Antibody Technology Program Phase II: Characterization of an Anti-BclA Antibody Produced by Illumina, Inc. 2021.
13. Moteshareie H, Hassen WM, Dirieh Y, Groulx E, Dubowski JJ, Tayabali AF. Rapid, Sensitive, and Selective Quantification of *Bacillus cereus* Spores Using xMAP Technology. Microorganisms. 2022 Jul 13;10(7):1408. DOI: 10.3390/microorganisms10071408

14. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы: учебно-методическое пособие. Под ред. Дятлова ИА. Оболонск: Династия, 2021.
15. Nowinski RC, Tam MR, Goldstein LC, Stong L, Kuo CC, Corey L, et al. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. Science. 1983 Feb 11;219(4585):637-44. DOI: 10.1126/science.6297006
16. Hames BD. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Ed. by Hames BD, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 1998.
17. Gallagher SR, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. Curr Protoc Cell Biol. 2001 May;Chapter 6:Unit 6.2. DOI: 10.1002/0471143030.cb0602s00

References

1. Hilmas CJ and Anderson J. Anthrax. in Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 2015;387-410.
2. Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, et al. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. Nature Microbiology. 2019;4:1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
3. Shishkova NA, Tyurin EA, Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN. Danger of anthrax in modern conditions. Ecological and epidemiological aspects. Science City: Science, Production, Society. 2017;3:29-34. (In Russian).
4. Williams DD, Turnbough CL. Surface Layer Protein EA1 Is Not a Component of *Bacillus anthracis* Spores but Is a Persistent Contaminant in Spore Preparations. J of Bacteriology. 2004;186:566-569. DOI: 10.1128/jb.186.2.566-569.2004
5. Swiecki MK, Lisanby MW, Shu F, Turnbough CL Jr, Kearney JF. Monoclonal antibodies for *Bacillus anthracis* spore detection and functional analyses of spore germination and outgrowth. J Immunol. 2006 May 15;176(10):6076-84. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.6076
6. Kuehn A, Kovác P, Saksena R, Bannert N, Klee SR, Ranisch H, et al. Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. Clin Vaccine Immunol. 2009 Dec;16(12):1728-37. DOI: 10.1128/CVI.00235-09
7. Tamborini M, Bauer M, Bolz M, Maho A, Oberli MA, Werz DB, et al. Identification of an African *Bacillus anthracis* lineage that lacks expression of the spore surface-associated anthrose-containing oligosaccharide. J Bacteriol. 2011 Jul;193(14):3506-11. DOI: 10.1128/JB.00078-11
8. Rodionov AP, Artemeva EA, Melnikova LA, Kosarev MA, Ivanova SV. Features of anthrax natural foci and *Bacillus anthracis* ecology. Veterinary Science Today. 2021;151-158. DOI: 10.29326/2304-196x-2021-2-37-151-158
9. Stewart GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. Microbiol Mol Biol Rev. 2015 Dec;79(4):437-57. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15
10. Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, et al. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16014-9. DOI: 10.1073/pnas.1109419108
11. Walper S, Lee P, Anderson G, Goldman E. Selection and Characterization of Single Domain Antibodies Specific for *Bacillus anthracis* Spore Proteins. Antibodies. 2013;2:152-167. DOI: 10.3390/antib2010152
12. Buckley PE, Calm AM, Welsh H, Thompson R, Menking D, Carney J, et al. US Army Combat Capabilities Development Command Chemical Biological Center/EXCET, I. Defense Advanced Research Projects Agency Antibody Technology Program Phase II: Characterization of an Anti-BclA Antibody Produced by Illumina, Inc. 2021.
13. Moteshareie H, Hassen WM, Dirieh Y, Groulx E, Dubowski JJ, Tayabali AF. Rapid, Sensitive, and Selective Quantification of *Bacillus cereus* Spores Using xMAP Technology. Microorganisms. 2022 Jul 13;10(7):1408. DOI: 10.3390/microorganisms10071408

14. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN. Methods for studying biological and molecular genetic properties of the anthrax pathogen: a teaching aid. Edited by Dyatlov IA. Obolensk: Dynasty Publ., 2021. (In Russian).
15. Nowinski RC, Tam MR, Goldstein LC, Stong L, Kuo CC, Corey L, et al. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. Science. 1983 Feb 11;219(4585):637-44. DOI: 10.1126/science.6297006
16. Hames BD. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Ed. by Hames BD, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 1998.
17. Gallagher SR, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. Curr Protoc Cell Biol. 2001 May;Chapter 6:Unit 6.2. DOI: 10.1002/0471143030.cb0602s00

Информация о соавторах:

Яковлева Вера Александровна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Vera A. Yakovleva, Junior Researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

Evgeny A. Panfertsev, MD, PhD, Senior Researcher of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Raisa I. Mironova, Researcher, Department of especially dangerous infections, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

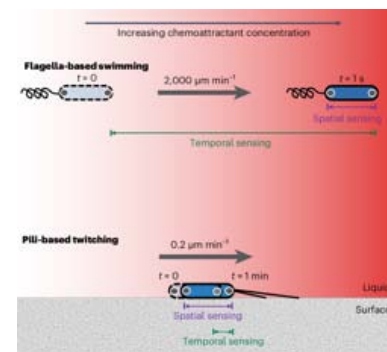
Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Head, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

Sergey S. Vetchinin, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Бактериальные клетки могут использовать пространственное восприятие химических градиентов для управления хемотаксисом

Плавающие бактерии, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, демонстрируют удивительные способности к перемещению в ответ на химические градиенты, что является важным аспектом их хемотаксического поведения. Эти микроорганизмы используют временное зондирование, чтобы обнаруживать изменения концентрации веществ вокруг себя с течением времени. Это позволяет им адаптироваться к окружающей среде и находить источники питательных веществ или избегать токсичных соединений. Однако прикрепленные к поверхности бактерии, такие как *P. aeruginosa*, применяют совершенно иной подход к хемотаксису. В недавних исследованиях, в которых использовались микрофлюидные эксперименты, массивное параллельное отслеживание клеток и флуоресцентные репортеры, ученые смогли детально изучить, как эти бактерии ощущают химические градиенты. В частности, внимание было уделено пилообразным структурам, которые «дергаются» на поверхности клеток. Эти структуры играют ключевую роль в том, как бактерии воспринимают изменения в концентрации химических веществ. Интересно, что в отличие от плавающих клеток, временные изменения концентрации не влияют на подвижность дергающихся клеток *P. aeruginosa*. Это открытие опровергает традиционное представление о том, что бактериальные клетки, будучи столь малыми, не могут эффективно воспринимать химические градиенты. Вместо этого исследования показали, что неподвижные клетки способны количественно оценивать хемотаксическое поведение, отслеживая изменения в субклеточной локализации флуоресцентных белков. Это происходит даже в условиях, когда градиент изменяет свое направление. Таким образом, *P. aeruginosa* может ощущать различия в концентрации химических веществ по всей длине своего тела, что позволяет им реагировать на изменения окружающей среды с высокой точностью. Это открытие имеет важные биологические и медицинские последствия, поскольку *P. aeruginosa* является патогеном, способным вызывать инфекции у людей с ослабленным иммунитетом. Понимание механизмов, с помощью которых эти бактерии обнаруживают и реагируют на химические сигналы, может помочь в разработке новых методов лечения инфекций и в борьбе с устойчивостью к антибиотикам. Эти исследования также подчеркивают важность взаимодействия между микроорганизмами и их окружением, а также роль, которую играют физические и химические свойства среды в определении поведения бактерий. В будущем дальнейшие исследования могут привести к новым открытиям в области микробиологии, экологии и медицины, открывая новые горизонты для понимания жизнедеятельности бактерий и их взаимодействия с окружающим миром.



Wheeler JHR, Foster KR, Durham WM.

Individual bacterial cells can use spatial sensing of chemical gradients to direct chemotaxis on surfaces. Nat Microbiol. 2024 Sep;9(9):2308-2322. DOI: 10.1038/s41564-024-01729-3

Изучение свойств поливалентной сыворотки кишечного иерсиниоза, полученной от экспериментальных животных с применением различных схем иммунизации

Л.Н.Туйчиев^{1,2}, А.М.-Т.Бектимиров¹, Н.У.Таджиева^{1,2}, О.Ш.Касимов¹,
А.О.Абдуллаев³, Ж.А.Анваров^{1,2}, И.Х.Маматкулов⁴

¹Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан;

³Ташкентский международный университет Кимё, Ташкент, Республика Узбекистан;

⁴Узбекский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт им. А.Султанова, Ташкент, Республика Узбекистан

В статье описаны результаты получения поливалентной сыворотки у экспериментальных животных путем гипериммунизации, а также динамика общего белка, альбуминов, глобулинов, показателей IgA, IgM, IgG, активность сывороток с использованием расширенной реакции агглютинации в предметных стеклах и пробирках на стадиях гипериммунизации. Увеличение количества глобулинов наблюдалось как иммунный ответ в организме экспериментальных животных на 7, 14, 21, 28-й дни иммунизации.

В сыворотках крови, полученных от экспериментальных животных, которым вводили совместно с инактивированными корпускулярными и растворимыми антигенами сероварных штаммов *Yersinia enterocolitica*, на 28-е сутки эксперимента наблюдались высокие показатели общего белка, альбумина, глобулина и IgG.

Ключевые слова: кишечный иерсиниоз, *Yersinia enterocolitica*, гипериммунизация, поливалентная сыворотка, общий белок, альбумин, глобулин, IgA, IgM, IgG, агглютинация, антиген

Для цитирования: Туйчиев Л.Н., Бектимиров А.М.-Т., Таджиева Н.У., Касимов О.Ш., Абдуллаев А.О., Анваров Ж.А., Маматкулов И.Х. Изучение свойств поливалентной сыворотки кишечного иерсиниоза, полученной от экспериментальных животных с применением различных схем иммунизации. Бактериология. 2024; 9(4): 34–40. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-34-40

Studying the properties of polyvalent serum of intestinal yersinosis obtained from experimental animals using various immunization scheme

L.N.Tuychiev^{1,2}, A.M.-T.Bektimirov¹, N.U.Tadjieva^{1,2}, O.Sh.Kasimov¹,
A.O.Abdullaev³, Zh.A.Anvarov^{1,2}, I.Kh.Mamatkulov⁴

¹Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²Tashkent Medical Academy, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

³Tashkent Kimyo International University, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

⁴A.Sultanov Uzbek Research Chemical and Pharmaceutical Institute, Tashkent, Republic of Uzbekistan

The article describes the results of obtaining polyvalent serum in experimental animals by hyperimmunization, as well as the dynamics of total protein, albumins, globulins, IgA, IgM, IgG indicators, serum activity using an expanded agglutination reaction in glass slides and test tubes. at the stages of hyperimmunization.

An increase in the amount of globulins was observed as an immune response in the body of experimental animals on days 7–14–21–28 of immunization.

Для корреспонденции:

Туйчиев Лазиз Надирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных и детских инфекционных болезней Ташкентской медицинской академии

Адрес: 100109, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Фароби, 2

Статья поступила 18.02.2024 принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Laziz N. Tuychiev, MD, PhD, DSc, professor, Head of Infectious and Children's Infectious Diseases Department of the Tashkent Medical Academy

Address: 2 Farobiy str., Tashkent, 100109, Respublica Uzbekistan

The article was received 18.02.2024, accepted for publication 25.12.2024

In blood sera obtained from experimental animals that were administered together with inactivated corpuscular and soluble antigens of serovar strains of *Yersinia enterocolitica*, high levels of total protein, albumin, globulin and IgG were observed on the 28th day of the experiment.

Key words: *intestinal yersiniosis, Yersinia enterocolitica, hyperimmunization, polyvalent serum, total protein, albumin, globulin, IgA, IgM, IgG, agglutination, antigen*

For citation: Tuychiev L.N., Bektimirov A.M.-T., Tadjieva N.U., Kasimov O.Sh., Abdullaev A.O., Anvarov Zh.A., Mamatkulov I.Kh. Studying the properties of polyvalent serum of intestinal yersiniosis obtained from experimental animals using various immunization scheme. *Bacteriology*. 2024; 9(4): 34–40. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-34-40

В настоящее время бактериальные инфекции представляют собой глобальную проблему. Примером тому являются бактерии рода *Yersinia*, представители которого вызывают опасные инфекционные заболевания. Представители рода *Yersinia* из семейства *Enterobacteriaceae* – грамотрицательные палочки, факультативные анаэробы. Род включает в себя 18 видов, самые распространенные из них: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Y. pestis* (возбудитель чумы) [1–4]. К энтеропатогенным иерсиниям относят возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica*). Основным резервуаром возбудителя являются грызуны [5, 6].

Бактериологический метод, используемый при диагностике кишечного иерсиниоза, характеризуется высокой трудоемкостью, длительными сроками выделения возбудителей, низкой эффективностью, дает большое количество ложных выделений иерсиниозных культур, что связано со значительной обсемененностью патологического материала кишечной микрофлорой и несовершенством методов выделения. Серологические методы диагностики значительно повышают эффективность выделения иерсиний [7, 8].

Стандартные сыворотки важны для эффективности серологических исследований. Их получают путем гипериммунизации.

Гипериммунизация – это метод парентерального введения животным нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма, а, следовательно, и максимального увеличения в крови животных специфических антител, которое должно обеспечивать лечебный, профилактический и диагностический эффект препаратов [9, 10].

В целях совершенствования мероприятий против кишечного иерсиниоза необходимо в первую очередь усовершенствовать методы диагностики этой инфекции. Для выявления возбудителей основных сероваров (*Y. enterocolitica* O5, *Y. enterocolitica* O9), полученных от больных и из объектов внешней среды, необходимо получить агглютинирующие сыворотки. Это, в свою очередь, создает основу для ранней и своевременной диагностики кишечного иерсиниоза и проведения соответствующих профилактических мероприятий.

Цель исследования заключается в изучении свойств поливалентных сывороток кишечного иерсиниоза, полученных от экспериментальных животных по различным схемам иммунизации.

Материалы и методы

Для гипериммунизации использовали 12 кроликов весом от 2,3 до 3,3 кг в возрасте от 4 до 6 мес. Эксперименты про-

водились в соответствии с методическим пособием «Методика и правила работы с лабораторными животными при экспериментальных микробиологических и иммунологических исследованиях», утвержденным Министерством здравоохранения Республики Узбекистан в 2016 г. [11].

Бактериологический метод. В процессе получения сывороток использовали штаммы сероваров O3 *Y. enterocolitica* 005011/659 и O9 *Y. enterocolitica* 005008/656. Экспериментальным животным вводили приготовленную в различных концентрациях по стандарту МакФарланда суспензию культур этих штаммов, которые культивированы на нейтральном агаре. Экспериментальных животных содержали в карантине в течение 21 дня.

Кролики были разделены на 4 группы по 3 особи:

- в I группе при 1-й иммунизации кроликов прививали штаммом *Y. enterocolitica* 005011/659 серовара O3 (концентрация корпускулярных микробных клеток 4 млрд кл./мл), при 2-й – 8 млрд кл./мл, при 3-й – 16 млрд кл./мл, при 4-й – 20 млрд кл./мл, при 5-й – 25 млрд кл./мл;

- во II группе при 1-й иммунизации прививали штаммом *Y. enterocolitica* 005011/659 серовара O3 концентрацией 4 млрд кл./мл растворимого и корпускулярного антигена в соотношении 1:1, при 2-й – 4 млрд кл./мл растворимого антигена, при 3-й – 16 млрд кл./мл растворимого и корпускулярного антигена в соотношении 1:1, при 4-й – 20 млрд кл./мл растворимого и корпускулярного антигена в соотношении 1:1, при 5-й – 25 млрд кл./мл растворимого антигена;

- в III группе при 1-й иммунизации прививали штаммом *Y. enterocolitica* 005008/656 серовара O9 корпускулярных микробных клеток концентрацией 4 млрд кл./мл, при 2-й – 8 млрд кл./мл, при 3-й – 16 млрд кл./мл, при 4-й – 20 млрд кл./мл, при 5-й – 25 млрд кл./мл;

- в IV группе при 1-й иммунизации прививали штаммом *Y. enterocolitica* 005008/656 серовара O9 концентрацией 4 млрд кл./мл растворимого и корпускулярного антигена в соотношении 1:1, при 2-й – 4 млрд кл./мл растворимого антигена, при 3-й – 16 млрд кл./мл растворимого и корпускулярного антигена в соотношении 1:1, при 4-й – 20 млрд кл./мл растворимого и корпускулярного антигена в соотношении 1:1, при 5-й – 25 млрд кл./мл растворимого антигена.

Всем животным вводили по 1,6 мл инактивированной культуры *Y. enterocolitica* или растворимого антигена в 8 точек: первые 4 точки – подкожно вдоль позвоночника с двух сторон (1–4), следующие 4 точки – внутримышечно в мышцы обеих передних и задних лап (5–8). Объем инъекции в каждой точке составлял 0,2 мл.

Серологический метод. Исследования выполнены в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Узбекистан №170 от 19 апреля 2004 г. «О совершенствовании мер борьбы с иерсиниозами».

Иммунологические исследования. Для иммуноферментного определения общих иммуноглобулинов А, М и G, а также иммуноглобулинов классов М и G к возбудителям кишечного иерсиниоза использовали набор реагентов («Вектор-Бест», Россия). Результаты были оценены в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ количества **общего белка, альбуминов и глобулинов** проводился ферментативно-колориметрическим методом на биохимическом анализаторе (Mindray BA-88A, КНР). Результаты оценивали в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический метод. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с использованием программы Excel-Office 2013 с применением t-критерия Стьюдента. Вычисляли среднюю квадратичную ошибку (*m*), а также достоверность различий значений в сравниваемых группах. Различия считали достоверным при *p* < 0,05. Номинальные данные описаны с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных производилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, точного критерия Фишера. Различия считались достоверными при *p* < 0,05.

Результаты исследования и анализ

Изменение количества альбуминов и глобулинов в составе общего белка и белковых фракций считается ответной реакцией организма на гипериммунизацию. Глобулины участвуют в транспорте липидов, гормонов, витаминов и

ионов металлов в организме, их значение в иммунной системе доказано. Увеличение количества глобулинов как иммунный ответ наблюдалось в организме экспериментальных животных на 7, 14, 21 и 28-й дни иммунизации (табл. 1). Тенденция к увеличению содержания общего белка на эти же дни иммунизации также указывает на активацию защитного механизма, а содержание альбумина увеличивалось с $34,03 \pm 1,126$ г/л до $54,30 \pm 0,794$ г/л за счет увеличения содержания общего белка, повышенного до $70,33 \pm 2,345$ г/л.

IgM классическим путем влияет на активацию комплемента. Антитела этого класса вырабатываются при воздействии на организм инфекционного агента. Тот факт, что его количество при иммунизации не превышало стандартного уровня, свидетельствует о том, что заболевание не развилось в организме кролика.

Количество IgA и IgM в сыворотке крови увеличивалось на 7-й и 14-й день после иммунизации, снижалось на 21, 28, 35-й день. Количество IgG увеличивалось на 7, 14, 21 и 28-й дни после иммунизации и начинало снижаться через 35 дней. Этот иммуноглобулин обеспечивает память организма против инфекционного агента и обеспечивает вторичный гуморальный ответ на инфекцию.

Период полураспада IgG составляет 23–35 дней. Поэтому после 5-й иммунизации, т.е. с 35-го дня, его количество стало уменьшаться.

Не выявлены достоверные изменения к возбудителю кишечного иерсиниоза на показателях IgM (*p* = 0,1–0,29) и IgG (*p* = 0,08–0,56).

Таблица 1. Результаты гипериммунизации экспериментальных животных I группы
 Table 1. Results of hyperimmunization of experimental animals of group I

Показатели / Indicators	До иммунизации / Before immunization			После 1-й иммунизации / After 1 st immunization		После 2-й иммунизации / After 2 nd immunization		После 3-й иммунизации / After 3 rd immunization		После 4-й иммунизации / After 4 th immunization		После 5-й иммунизации / After 5 th immunization	
	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>p</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>p</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>p</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>p</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>p</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>p</i>
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	68,37 ± 2,554	97,90 ± 0,624	0,001	89,57 ± 0,498	0,003	104,80 ± 1,419	0,001	106,6 ± 7,123	0,01	59,2 ± 3,782	0,13*		
Альбумин, г/л / Albumin, g/l	34,03 ± 1,126	28,77 ± 1,017	0,04	45,20 ± 0,361	0,002	54,30 ± 0,794	0,0006	53,8 ± 3,78	0,01	30,6 ± 1,935	0,22*		
Глобулин, г/л / Globulin, g/l	34,33 ± 1,538	69,13 ± 1,102	0,0003	44,43 ± 0,348	0,007	50,50 ± 0,814	0,002	52,8 ± 3,355	0,01	28,6 ± 1,85	0,09*		
A/G, г/л / A/G, g/l	0,99 ± 0,025	0,41 ± 0,021	0,0003	1,01 ± 0,012	0,52*	1,07 ± 0,017	0,07*	1,01 ± 0,012	0,52*	1,06 ± 0,007	0,07*		
IgA, мг/мл (mg/ml)	0,28 ± 0,027	0,15 ± 0,012	0,02	0,23 ± 0,037	0,35*	0,11 ± 0,007	0,008	0,31 ± 0,023	0,45*	0,26 ± 0,006	0,52*		
IgM, мг/мл (mg/ml)	1,14 ± 0,090	0,42 ± 0,006	0,004	0,34 ± 0,009	0,003	0,18 ± 0,012	0,001	0,24 ± 0,012	0,002	0,18 ± 0,003	0,001		
IgG, мг/мл (mg/ml)	1,07 ± 0,260	0,69 ± 0,086	0,25*	0,97 ± 0,212	0,78*	1,64 ± 0,028	0,11*	5,78 ± 0,236	0,001	1,68 ± 0,027	0,10*		
IgM к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,08 ± 0,007	0,10 ± 0,005	0,10*	0,10 ± 0,014	0,29*	0,11 ± 0,005	0,03	0,12 ± 0,021	0,016*	0,12 ± 0,003	0,01		
IgG к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,10 ± 0,007	0,12 ± 0,004	0,08*	0,12 ± 0,010	0,19*	0,13 ± 0,003	0,02	0,11 ± 0,014	0,056*	0,11 ± 0,004	0,30*		

* различия показателей до иммунизации не имеют статистического значения, ОП – оптическая плотность.
 * differences in indicators before immunization have no statistical significance, OD – optical density.

Таблица 2. Результаты гипериммунизации экспериментальных животных II группы

Table 2. Results of hyperimmunization of experimental animals of group II

Показатели / Indicators	До иммунизации / Before immunization			После 1-й иммунизации / After 1 st immunization			После 2-й иммунизации / After 2 nd immunization			После 3-й иммунизации / After 3 rd immunization			После 4-й иммунизации / After 4 th immunization			После 5-й иммунизации / After 5 th immunization		
	M ± m	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p			
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	77,87 ± 2,888	91,63 ± 3,631	0,05	87,17 ± 14,11	0,56*	114,47 ± 10,52	0,04	121,9 ± 19,32	0,1*	60,87 ± 4,468	0,04							
Альбумин, г/л / Albumin, g/l	38,57 ± 1,445	33,4 ± 1,15	0,06	44,97 ± 7,872	0,48*	58,03 ± 5,04	0,03	62,13 ± 9,421	0,08*	31,2 ± 2,159	0,05							
Глобулин, г/л / Globulin, g/l	39,3 ± 1,443	58,23 ± 4,269	0,02	42,2 ± 6,278	0,68*	56,43 ± 5,538	0,05	59,1 ± 9,34	0,12*	29,67 ± 2,318	0,03							
A/G, г/л / A/G, g/l	0,98 ± 0,003	0,58 ± 0,061	0,007	1,05 ± 0,035	0,14*	1,03 ± 0,022	0,1*	1,05 ± 0,018	0,03	1,05 ± 0,015	0,01							
IgA, мг/мл (mg/ml)	0,26 ± 0,033	0,17 ± 0,009	0,07*	0,29 ± 0,075	0,73*	0,11 ± 0,006	0,02	0,31 ± 0,038	0,39*	0,25 ± 0,013	0,79*							
IgM, мг/мл (mg/ml)	0,91 ± 0,046	0,40 ± 0,006	0,001	0,34 ± 0,042	0,002	0,16 ± 0,012	0,0005	0,21 ± 0,013	0,001	0,18 ± 0,003	0,0005							
IgG, мг/мл (mg/ml)	1,48 ± 0,124	1,15 ± 0,165	0,20*	0,88 ± 0,017	0,01	1,56 ± 0,074	0,61*	8,28 ± 0,549	0,001	1,73 ± 0,024	0,14*							
IgM к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,09 ± 0,002	0,09 ± 0,014	1,0*	0,09 ± 0,007	1,0*	0,1 ± 0,015	0,55*	0,11 ± 0,012	0,19*	0,12 ± 0,021	0,25*							
IgG к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,09 ± 0,007	0,10 ± 0,006	0,35*	0,107 ± 0,012	0,30*	0,12 ± 0,016	0,18*	0,10 ± 0,008	0,41*	0,10 ± 0,013	0,54*							

* различия показателей до иммунизации не имеют статистического значения, ОП – оптическая плотность.

* differences in indicators before immunization have no statistical significance, OD – optical density.

Таблица 3. Результаты гипериммунизации экспериментальных животных III группы

Table 3. Results of hyperimmunization of experimental animals of group III

Показатели / Indicators	До иммунизации / Before immunization			После 1-й иммунизации / After 1 st immunization			После 2-й иммунизации / After 2 nd immunization			После 3-й иммунизации / After 3 rd immunization			После 4-й иммунизации / After 4 th immunization			После 5-й иммунизации / After 5 th immunization		
	M ± m	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p			
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	71,57 ± 4,114	91,07 ± 3,755	0,03	100,47 ± 2,033	0,008	106,37 ± 5,393	0,01	113,3 ± 15,112	0,07*	62,43 ± 4,476	0,22*							
Альбумин, г/л / Albumin, g/l	35,5 ± 2,007	33,97 ± 1,92	0,62*	51,37 ± 1,035	0,005	53,63 ± 2,521	0,01	59,13 ± 7,279	0,05	32,4 ± 2,219	0,37*							
Глобулин, г/л / Globulin, g/l	36,07 ± 2,114	57,1 ± 1,877	0,005	49,1 ± 1,002	0,01	52,73 ± 2,89	0,01	56,2 ± 7,535	0,08*	30,03 ± 2,315	0,14*							
A/G, г/л / A/G, g/l	0,98 ± 0,006	0,59 ± 0,015	0,0001	1,04 ± 0,003	0,002	1,01 ± 0,02	0,24*	1,01 ± 0,009	0,06*	1,08 ± 0,029	0,04							
IgA, мг/мл (mg/ml)	0,14 ± 0,015	0,12 ± 0,015	0,41*	0,26 ± 0,044	0,08*	0,08 ± 0,003	0,02	0,30 ± 0,012	0,003	0,24 ± 0,13	0,50*							
IgM, мг/мл (mg/ml)	1,01 ± 0,046	0,41 ± 0,007	0,001	0,33 ± 0,006	0,001	0,17 ± 0,003	0,0003	0,2 ± 0,003	0,0004	0,2 ± 0,012	0,0004							
IgG, мг/мл (mg/ml)	1,35 ± 0,161	1,15 ± 0,129	0,40*	1,13 ± 0,197	0,45*	1,57 ± 0,037	0,27*	6,37 ± 0,46	0,001	1,66 ± 0,031	0,15*							
IgM, к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM, to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,10 ± 0,010	0,09 ± 0,008	0,49*	0,09 ± 0,012	0,56*	0,10 ± 0,012	1,0*	0,11 ± 0,013	0,58*	0,12 ± 0,017	0,38*							
IgG к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM, to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,08 ± 0,006	0,10 ± 0,007	0,11*	0,11 ± 0,011	0,09*	0,11 ± 0,017	0,19*	0,09 ± 0,008	0,90*	0,11 ± 0,013	0,12*							

* различия показателей до иммунизации не имеют статистического значения, ОП – оптическая плотность.

* differences in indicators before immunization have no statistical significance, OD – optical density.

Таблица 4. Результаты гипериммунизации экспериментальных животных IV группы
 Table 4. Results of hyperimmunization of experimental animals of group IV

Показатели / Indicators	До иммунизации / Before immunization			После 1-й иммунизации / After 1 st immunization		После 2-й иммунизации / After 2 nd immunization		После 3-й иммунизации / After 3 rd immunization		После 4-й иммунизации / After 4 th immunization		После 5-й иммунизации / After 5 th immunization	
	M ± m	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p	M ± m	p
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	74,1 ± 4,823	104,37 ± 6,702	0,03	96,37 ± 2,369	0,02	123,03 ± 5,387	0,01	114,97 ± 12,486	0,05	64,87 ± 7,496	0,37*		
Альбумин, г/л / Albumin, g/l	37,07 ± 2,293	33,23 ± 3,206	0,40*	49,5 ± 2,291	0,10*	62,47 ± 2,72	0,005	58,17 ± 6,288	0,05	34,03 ± 2,285	0,63*		
Глобулин, г/л / Globulin, g/l	37,03 ± 2,531	71,13 ± 9,136	0,03	46,87 ± 0,406	0,03	60,57 ± 2,667	0,01	50,07 ± 12,724	0,38*	30,83 ± 5,219	0,36*		
A/G, г/л / A/G, g/l	1,00 ± 0,006	0,49 ± 0,092	0,01	1,04 ± 0,037	0,36*	1,03 ± 0,003	0,02	1,29 ± 0,273	0,36*	1,15 ± 0,145	0,37*		
IgA, мг/мл (mg/ml)	0,15 ± 0,015	0,13 ± 0,012	0,37*	0,26 ± 0,019	0,01	0,09 ± 0,003	0,02	0,33 ± 0,007	0,001	0,26 ± 0,003	0,005		
IgM, мг/мл (mg/ml)	0,40 ± 0,038	0,40 ± 0,006	1,0*	0,37 ± 0,021	0,53*	0,17 ± 0,003	0,01	0,19 ± 0,006	0,01	0,19 ± 0,009	0,01		
IgG, мг/мл (mg/ml)	1,25 ± 0,128	1,08 ± 0,136	0,42*	0,93 ± 0,234	0,31*	1,78 ± 0,06	0,03	6,91 ± 0,774	0,005	1,69 ± 0,086	0,05		
IgM, к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgM, to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,10 ± 0,009	0,10 ± 0,014	1,0*	0,11 ± 0,01	0,51*	0,10 ± 0,014	1,0*	0,12 ± 0,023	0,47*	0,12 ± 0,007	0,17		
IgG к возбудителю кишечного иерсиниоза, ОП / IgG, to the causative agent of intestinal yersiniosis, OD	0,11 ± 0,007	0,10 ± 0,016	0,60*	0,13 ± 0,018	0,37*	0,11 ± 0,008	1,0*	0,11 ± 0,017	1,0*	0,11 ± 0,008	1,0*		

* различия показателей до иммунизации не имеют статистического значения, ОП – оптическая плотность.
 * differences in indicators before immunization have no statistical significance, OD – optical density.

По данным анализа сыворотки крови экспериментальных животных II группы, повышение общего белка с 91,63 ± 3,631 г/л до 121,9 ± 19,32 г/л на 7–28-й дни иммунизации свидетельствует о резкой защитной реакции организма экспериментальных животных (табл. 2). На 35-е сутки эксперимента содержание общего белка снизилось до 60,87 ± 4,468 г/л, что свидетельствует о процессе адаптации. Концентрация альбуминов за этот период увеличилась с 33,4 ± 1,15 г/л до 62,13 ± 9,421 г/л за счет увеличения общего белка и на 35-е сутки составила 31,2 ± 2,159 г/л.

На 7–28-й дни иммунизации количество глобулина увеличивалось до 58,23 ± 4,269 – 59,1 ± 9,34 г/л, а на 35-е сутки, наоборот, этот показатель снижался до 29,67 ± 2,318 г/л.

Количество IgA в сыворотке крови увеличивалось с 0,17 ± 0,009 мг/мл до 0,29 ± 0,075 мг/мл на 7–14-й дни иммунизации и снижалось до 0,11 ± 0,006 мг/мл на 21-е сутки, до 0,58 ± 0,054 мг/мл на 28-е сутки и до 0,25 ± 0,013 мг/мл на 35-е сутки. Вышеуказанные изменения количества этого иммуноглобулина в крови экспериментальных животных находились в пределах нормы.

Количество IgM снижалось до 0,40 ± 0,006 мг/мл на 7, 14, 21-е сутки после иммунизации, до 0,21 ± 0,013 мг/мл на 28-е сутки и до 0,18 ± 0,003 мг/мл на 35-е сутки. Учитывая, что IgM постепенно превращается в IgG, количество IgG увеличивалось с 1,15 ± 0,165 мг/мл до 8,28 ± 0,549 мг/мл на 7, 14, 21, 28-й дни и до 1,73 ± 0,024 мг/мл на 35-е сутки после иммунизации и снова начало снижаться до 0,024. Это показатель стандартного уровня, который показал адекватность иммунного ответа у экспериментальных животных.

Достоверных изменений показателей IgM ($p = 0,19–1$) и IgG ($p = 0,18–0,54$) возбудителя кишечного иерсиниоза не выявлено.

На 7, 14, 21, 28-е сутки иммунизации количество общего белка у опытных животных III группы увеличилось с 91,07 ± 3,755 г/л до 113,3 ± 15,112 г/л, а количество альбумина – с 33,97 ± 1,92 г/л до 59,13 ± 7,279 г/л. (табл. 3). На 35-й день иммунизации эти показатели составили 62,43 ± 4,476 г/л и 32,4 ± 2,219 г/л соответственно. Аналогично количество глобулинов увеличивалось на 7, 14, 21 и 28-е сутки иммунизации и снижалось на 35-е сутки.

Наблюдали, что количество IgA в сыворотке крови снижалось до 0,12 ± 0,015 мг/мл и 0,26 ± 0,044 мг/мл соответственно на 7-е и 14-е сутки, на 21-е сутки – до 0,08 ± 0,003 мг/мл, на 28-е сутки – до 0,30 ± 0,012 мг/мл, на 35-е сутки – до 0,24 ± 0,13 мг/мл.

Установлено, что количество IgM снижалось с 0,41 ± 0,007 мг/мл до 0,17 ± 0,003 мг/мл на 7, 14, 21-е сутки после иммунизации и оставалось стабильным на уровне 0,2 ± 0,003 – 0,2 ± 0,012 мг/мл на 28–35-е сутки.

Повышение IgG с 1,15 ± 0,129 мг/мл до 6,37 ± 0,46 мг/мл на 7, 14, 21, 28-й дни после иммунизации свидетельствовало о нормальном иммунном ответе у экспериментальных животных.

Достоверных изменений показателей IgM и IgG к возбудителю кишечного иерсиниоза не наблюдалось ($p = 0,38–1$; $p = 0,09–0,9$ соответственно).

Количество общего белка в сыворотке крови подопытных животных IV группы снизилось со 104,37 ± 6,702 г/л до 96,37 ±

Таблица 5. Динамика изменения титра антител у экспериментальных животных, иммунизированных штаммами *Y. enterocolitica*
 Table 5. Dynamics of changes in antibody titers in experimental animals immunized with *Y. enterocolitica* strains

Группа животных / Animal group	До иммунизации / Before immunisation		Динамика антител / Antibody dynamics									
			7-й день / Day 7		14-й день / Day 14		21-й день / Day 21		28-й день / Day 28		35-й день / Day 35	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
I	0	0	-	-	-	-	+	1:133	++	1:266	+++	1:800
II	0	0	-	-	-	-	+	1:50	+	1:133	+++	1:400
III	0	0	-	-	+	1:50	+	1:400	+	1:800	+++	1:11733
IV	0	0	+	-	+	-	+	1:300	+	1:533	+++	1:4266

A – реакция агглютинации на предметном стекле; B – расширенная реакция агглютинация в пробирках. Приведен средний арифметический титр серологических реакций. Обозначения: -- отрицательный, +- слабopоложительный, ++ положительный, +++ сильно положительный, ++++ резко положительный.
 A – agglutination reaction on a glass slide; B – extended agglutination reaction in test tubes. The arithmetic mean titer of serological reactions is given. Designations: -- negative, +- weakly positive, ++ positive, +++ strongly positive, ++++ sharply positive.

2,369 г/л на 7-й и 14-й дни иммунизации, а на 21–35-й дни иммунизации – с $123,03 \pm 5,387$ г/л до $64,87 \pm 7,496$ г/л. Наблюдалась тенденция снижения показателей общего белка (табл. 4).

Содержание глобулинов имело тенденцию к снижению с $71,13 \pm 9,136$ г/л до $46,87 \pm 0,406$ г/л на 7-е и 14-е сутки иммунизации и с $60,57 \pm 2,667$ г/л до $30,83 \pm 5,219$ г/л на 21-е и 35-е сутки. Это свидетельствовало о процессах адаптации в организме экспериментальных животных.

Содержание альбумина увеличилось с $33,23 \pm 3,206$ г/л до $62,47 \pm 2,72$ г/л после 1-3-й прививок, а после 4–5-й иммунизации снизилось с $58,17 \pm 6,288$ г/л до $34,03 \pm 2,285$ г/л. Наблюдалась тенденция к снижению.

IgA в сыворотке крови составлял $0,13 \pm 0,012$ мг/мл на 7-е сутки после иммунизации, $0,26 \pm 0,019$ мг/мл – на 14-е сутки, а на 21, 28, 35-е сутки иммунизации изменения количества IgA в сыворотке крови подопытных животных составляли соответственно $0,09 \pm 0,003$; $0,33 \pm 0,007$ и $0,26 \pm 0,003$ мг/мл. Было доказано, что защитная реакция организма на 20 млрд растворимого и корпускулярного антигена сильнее.

Количество IgM стабильно находилось на уровне $0,40 \pm 0,006$ – $0,37 \pm 0,021$ мг/мл через 7–14 дней после иммунизации, а с 21, 28, 35-го дней – до $0,17 \pm 0,003$ – $0,19 \pm 0,009$ мг/мл, наблюдалась тенденция к снижению. Количество IgG увеличивалось до $1,08 \pm 0,136$ – $6,91 \pm 0,774$ мг/мл на 7, 14, 21, 28-е сутки после иммунизации и резко снижалось до $1,69 \pm 0,086$ мг/мл после 5-й иммунизации. Данная ситуация показала, что в организме экспериментальных животных сформировался устойчивый вторичный иммунный ответ.

Достоверных изменений показателей IgM ($p = 0,47-1$) и IgG ($p = 0,37-1$) к возбудителю кишечного иерсиниоза не наблюдалось.

Сыворотки крови, полученные от экспериментальных животных (кроликов) IV группы на 7-й и 14-й дни иммунизации, показали слабopоложительный результат при тестировании с помощью реакции агглютинации на предметном стекле (табл. 5).

Сыворотку крови, полученную от экспериментальных животных III группы, исследовали по указанной выше реакции: на 14-е сутки наблюдался слабopоложительный результат.

На 21-е сутки иммунизации результат реакции агглютинации был слабopоложительным в сыворотках крови животных I и II групп, положительным – в сыворотках крови животных III и IV групп.

На 28-й день иммунизации исследованные с помощью реакции агглютинации на предметном стекле сыворотки крови подопытных животных II, III и IV групп дали положительный, а сыворотки крови животных I группы – резко положительный результат.

На 35-й день иммунизации, т.е. на 5-й иммунизации антигенами, все сыворотки дали резко положительный результат.

При исследовании сывороток крови, полученных от экспериментальных животных на этапах иммунизации, с помощью расширенной реакции агглютинации в пробирках результат наблюдался в сыворотке крови животных III группы в титре 1:50 на 14-й день иммунизации.

С 21-го дня иммунизации, т.е. с 3-й инокуляции корпускулярными и растворимыми антигенами *Y. enterocolitica*, выявлена реакция агглютинации, начиная со среднеарифметического титра 1:50 и до титра 1:400.

Средние титры от 1:133 (II группа) до 1:11733 (3-я группа) наблюдались в расширенной реакции агглютинации сывороток крови, полученных на 28-й (4-я иммунизация) и 35-й (5-я иммунизация) день иммунизации.

Заклучение

1. В организме экспериментальных животных наблюдалось увеличение количества глобулинов как иммунный ответ на 7, 14, 21 и 28-й дни иммунизации.

2. На 28-е сутки эксперимента выявлены высокие показатели общего белка, альбумина, глобулина и IgG в сыворотках крови животных II группы, которым были введены совместно корпускулярные и растворимые антигены штаммов серовара *Y. enterocolitica* O3.

3. В сыворотке крови IgA повышался на 14–28-е сутки, снижался на 21–35-е сутки, IgM снижался на 14-е и 21-е сутки, устойчивая тенденция наблюдалась через 28–35 суток.

4. Достоверных изменений показателей IgM и IgG в отношении возбудителя кишечного иерсиниоза не выявлено.

5. На 35-й день иммунизации (5-я иммунизация) антигенами все сыворотки дали резко положительный результат.

6. После 3-й иммунизации (с 21-го дня иммунизации) при исследовании сывороток крови, полученных от подопытных животных, с помощью реакции агглютинации в пробирках наблюдалось динамическое увеличение титра антител во всех группах.

7. Учитывая, что значения общего белка, альбумина, глобулина и IgG у подопытных кроликов наиболее высоки на 28-й день иммунизации, после 4-й недели от животных можно получить сыворотки с высоким титром.

8. Для получения полноценной активной гипериммунной сыворотки необходимо совместно использовать инактивированные корпускулярные и растворимые антигены.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Ахмедов РА, Касимов МС, Мамедзаде ФУ, Талыбзаде АН, Устун НМ. Кишечный иерсиниоз как природноочаговое заболевание. Биомедицина (Баку). 2009;2:36-37.
2. Галкина ЛА, Мескина ЕР. Алгоритм диагностики и лечения иерсиниозов у детей. Учебно-метод. пособие. М., 2022.
3. Карбышева НВ, Бобровский ЕА. Активность природных очагов и заболеваемость при иерсиниозной инфекции. Журнал инфектологии. 2016;8(2):52.
4. Сомова ЛМ, Андриуков БГ. К 60-летию открытия изучения дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019;6:85-89.
5. Дороженкова ТЕ, Горбич ОА. Эпидемиологический профиль кишечного иерсиниоза в Республике Беларусь. Военная медицина (Минск). 2020;4:85-89.
6. Дороженкова ТЕ, Горбич ОА. Эпидемиологическая характеристика и основы профилактики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза. Учебно-метод. пособие. Минск, 2022.
7. Есаулов АС, Митрофанова НН, Мельников ВЛ. Бактериологический метод лабораторной диагностики. Учеб. пособие. Пенза: Изд-во ПГУ, 2015.
8. Каримова ТВ. Энтеропатогенные иерсинии: микробиологический мониторинг, молекулярно-биологические особенности, алгоритм лабораторной диагностики. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Иркутск, 2017.
9. Назарова ЕВ, Захаров МВ. Разработка тест-системы для серологической диагностики иерсиниозов – «Иерсиния РПГА». Известия ГГТУ. Медицина. Фармация. 2020;4:221.
10. Шестакова ИВ, Ющук НД, Попова ТИ. Иерсиниоз: диагностические ошибки. Врач. 2007;7:71-74.
11. Нуралиев НА, Бектимиров АМ-Т. Методы и правила работы с лабораторными животными при экспериментальных микробиологических и иммунологических исследованиях. Методическое руководство. Ташкент, 2016.

References

1. Akhmedov RA, Kasimov MS, Mamedzade FU, Talybzade AN, Ustun NM. Intestinal yersiniosis as a natural focal disease. Biomedicine (Baku). 2009;2:36-37. (In Russian).
2. Galkina LA, Meskina ER. Algorithm for the diagnosis and treatment of yersiniosis in children. Educational manual. M., 2022. (In Russian).

3. Karbysheva NV, Bobrovsky EA. Activity of natural foci and morbidity in yersinia infection. Journal of Infectology. 2016;8(2):52. (In Russian).
4. Somova LM, Andriukov BG. To the 60th anniversary of the discovery of the study of Far Eastern scarlet-like fever. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2019;6:85-89. (In Russian).
5. Dorozhenkova TE, Gorbich OA. Epidemiological profile of intestinal yersiniosis in the Republic of Belarus. Military Medicine (Minsk). 2020;4:85-89. (In Russian).
6. Dorozhenkova TE, Gorbich OA. Epidemiological characteristics and basics of prevention of intestinal yersiniosis and pseudotuberculosis. Educational manual. Minsk, 2022. (In Russian).
7. Esaulov AS, Mitrofanova NN, Melnikov VL. Bacteriological method of laboratory diagnostics: textbook. Manual. Penza: PSU Publishing House, 2015. (In Russian).
8. Karimova TV. Enteropathogenic Yersinia: microbiological monitoring, molecular biological features, laboratory diagnostic algorithm. Avtoref. diss. ... kand. med. nauk. Irkutsk, 2017. (In Russian).
9. Nazarova EV, Zakharov MV. Development of a test system for serological diagnosis of yersiniosis – "Yersinia RPGA". News of GGTU. Medicine. Pharmacy. 2020;4:221. (In Russian).
10. Shestakova IV, Yushchuk ND, Popova TI. Yersiniosis: diagnostic errors. Doctor. 2007;7:71-74. (In Russian).
11. Nuraliev NA, Bektimirov AM-T. Methods and rules for working with laboratory animals during experimental microbiological and immunological studies. Methodological manual. Tashkent, 2016. (In Russian).

Информация о соавторах:

Бектимиров Амир Мангу-Темирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных болезней

Таджиева Нигора Убайдуллаевна, доктор медицинских наук, доцент кафедры инфекционных и детских инфекционных болезней Ташкентской медицинской академии

Касимов Одилжон Шодиевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных болезней

Абдуллаев Асилбек Онгдалиевич, MD, PhD, доцент кафедры химии и биологии Ташкентского международного университета Кимё, декан направления «Эстетика красоты»

Анваров Жахонгир Абралович, ассистент кафедры инфекционных и детских инфекционных болезней Ташкентской медицинской академии

Маматкулов Иброхим Хомидович, доктор медицинских наук, профессор, директор Узбекского научно-исследовательского химико-фармацевтического института им. А.Султанова

Information about co-authors:

Amir A-M. Bektimirov, MD, PhD, DSc, The Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious Diseases and Parasitic Diseases

Nigora U. Tadjieva, MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Infectious and Children's Infectious Diseases Department of Tashkent Medical Academy

Odiljon Sh. Kasimov, MD, PhD, DSc, The Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Epidemiology, Microbiology, Infectious Diseases and Parasitic Diseases

Jakhongir A. Anvarov, Senior lecturer of the Infectious and Children's Infectious Diseases Department of the Tashkent Medical Academy

Ibrokhir Kh. Mamatkulov, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the A.Sultanov Uzbek Research Chemical and Pharmaceutical Institute

Разработка теста на основе изотермической амплификации для диагностики малярии

И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов

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

В статье рассматриваются этапы создания тест-системы для диагностики малярии на основе изотермической амплификации. Малярия является одним из наиболее распространенных и опасных заболеваний в мире. Выявление одного из самых распространенных возбудителей малярии, *Plasmodium vivax*, в крови инфицированных людей – важный шаг в борьбе с этим заболеванием, поскольку позволяет своевременно начать лечебные и профилактические мероприятия и предотвратить распространение болезни и возможные осложнения. Тест-системы на основе изотермической амплификации для диагностики малярии имеют два преимущества: их можно использовать для детектирования низкоуровневой инфекции (<100 паразитов в 1 мкл крови), и для проведения анализа не требуется много времени и сложное оборудование. Разработанная нами тест-система с использованием отечественного фермента SD-полимеразы для диагностики малярии поможет улучшить диагностику и лечение малярии, особенно в регионах с ограниченными ресурсами.

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

Для цитирования: Щит И.Ю., Бикетов С.Ф. Разработка теста на основе изотермической амплификации для диагностики малярии. Бактериология. 2024; 9(4): 41–48. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-41-48

Development of an isothermal amplification test for the diagnosis of malaria

I.Yu.Shchit, S.F.Biketov

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The article discusses the process of creating a test for the diagnosis of malaria based on isothermal amplification. Malaria is one of the most common and dangerous diseases in the world. Identifying one of the most common malaria pathogens, *Plasmodium vivax*, in the blood of infected people is an important step in the fight against this disease, as it allows you to start treatment and preventive measures in a timely manner and prevent the spread of the disease and possible complications. The isothermal amplification test for the diagnosis of malaria has two advantages: it can be used to detect low-level infection (less than 100 parasites in a microliter of blood), and the analysis does not require a lot of time and complex equipment. The test we developed using the domestic SD polymerase enzyme for the diagnosis of malaria will help improve the diagnosis and treatment of malaria, especially in resource-limited regions.

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

For citation: Shchit I.Yu., Biketov S.F. Development of an isothermal amplification test for the diagnosis of malaria. Bacteriology. 2024; 9(4): 41–48. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-41-48

Малярия является серьезной проблемой общественного здравоохранения. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2022 г. в 85 странах мира было зарегистрировано 249 млн случаев заболевания малярией и 608 тыс. случаев смерти от малярии [1]. Существует 5 видов паразитов рода *Plasmodium*, вызывающих малярию у людей, причем два из этих видов – *P. falciparum* и *P. vivax* – представляют наибольшую угрозу. Инфекция, вызываемая

P. vivax, является одной из наиболее распространенных форм малярии во всем мире, на нее приходится ~35% всех ежегодных случаев заболевания [2]. Она особенно распространена в тропических регионах, таких как Южная Азия (Индия), Юго-Восточная Азия, Центральная и Западная Африка, где на ее долю приходится до 97% всех зарегистрированных случаев [3]. Малярия, обусловленная *P. vivax*, также встречается в других частях света, включая Латинскую

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 09.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, 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) 36-0065

The article was received 09.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

Америку, Северную Америку и даже Европу. Согласно данным Роспотребнадзора, в России ежегодно регистрируется от 10 до 50 случаев малярии, в основном у граждан, которые вернулись из стран Африки, Юго-Восточной Азии и Южной Америки. В Российской Федерации в 2023 г. число завозных случаев малярии составило 136 (в 2022 г. – 110) [4].

Возбудитель *P. vivax* (как и другие виды плазмодиев) заражает людей через укус инфицированного ими комара рода *Anopheles*; инокуляция возбудителя в кровь человека происходит в форме спорозоитов, которые затем развиваются в мерозоиты, вызывая симптомы лихорадки, такие как озноб, головная боль, мышечные боли, тошнота, рвота и диарея. Клинические проявления инфекции *P. vivax* различаются в зависимости от нескольких факторов, таких как возраст, иммунный статус, паразитарная нагрузка (количество мерозоитов) и устойчивость к применяемым лекарственным препаратам. В целом симптомы заболевания, как правило, более мягкие, чем в случаях инвазии, которые вызываемой другими видами *Plasmodium*, включая *P. falciparum*. Однако тяжелые случаи клинического проявления болезни могут возникать у людей с ослабленным иммунитетом или инвазии с высокой паразитарной нагрузкой (>10% эритроцитов). Кроме этого, возбудитель способен сохраняться длительное время в клетках печени в форме гипнозоитов, что создает основу для последующих обострений инфекции.

P. vivax обычно выявляется с помощью световой микроскопии, визуализирующей мерозоитов в мазках крови пациентов с уровнем от 50–200 паразитов в микролитре. Для обнаружения меньших концентраций *P. vivax* в крови были разработаны амплификационные молекулярно-генетические тесты. Постановка тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) требует сложного оборудования и квалифицированного персонала, поэтому их невозможно использовать для подтверждения диагноза и мониторинга ответа на проводимое лечение в регионах, удаленных от крупных медицинских центров. В отличие от ПЦР петлевая изотермическая амплификация (LAMP) не требует сложного оборудования и может быть осуществлена в слабо оснащенных лабораториях и даже в полевых условиях, поскольку амплификация ДНК при этом исследовании проходит при постоянной температуре и не требует использования термоциклера. Впервые этот метод был разработан в начале 2000-х гг. T.Notomi et al [5], которые использовали его для обнаружения бактериальной геномной ДНК, но позже технология была адаптирована для детекции других микроорганизмов, таких как вирусы, паразиты, грибки и даже раковые клетки. Принцип, лежащий в основе анализа LAMP, заключается в том, что определенный участок целевого генома может быть амплифицирован с использованием 4-6 праймеров (2 внешних и 2 внутренних) в сочетании с ферментом ДНК-полимеразой (обычно Bst или Bsm), способной вытеснять вторую цепь ДНК в изотермических условиях. Процесс амплификации происходит при постоянной температуре (обычно в диапазоне 60–65°C), что, несомненно, удобнее по сравнению с технологией ПЦР. Реакция амплификации приводит к экспоненциальному увеличению числа копий целевой последовательности, которую затем можно обнаружить с помощью целого ряда различных методов, в частности таких, как гель-электрофорез, нефелометрия или флуоро-

метрия в реальном времени или по конечной точке, с приборной регистрацией или визуализацией невооруженным глазом, например, на иммунохроматографических тест-полосках.

К настоящему времени опубликован ряд сообщений об успешном применении LAMP для диагностики малярии [6]. Для обнаружения *P. vivax* в клинических образцах разработаны несколько LAMP-тестов. Так, например, J.C.Patel et al. (2013) сообщают о создании теста RealAmp, который предусматривает проведение LAMP в портативном изотермическом приборе для быстрого обнаружения малярийных паразитов в режиме реального времени. Для амплификации использовали 3 пары праймеров к уникальной для генома *P. vivax* консервативной последовательности ДНК. Чувствительность обнаружения ДНК *P. vivax* в клинических образцах по сравнению с гнездовой ПЦР составила 94,59% (87,48–98,26%). RealAmp показал специфичность в интервале 90,40–100% [7].

Оценку диагностической точности LAMP с красителем малахитовым зеленым для визуализации продукта (MG-LAMP) проводили в удаленных медицинских пунктах штата Рорайма на севере Бразилии. В исследованиях принял участие 91 пациент. Чувствительность и специфичность MG-LAMP составили в среднем 90,0% (76,34–97,21%) и 94% (83,76–98,77%) соответственно. Исследователи отмечают, что MG-LAMP зарекомендовал себя как чувствительный, специфичный и простой в проведении молекулярный тест, который можно выполнять для обнаружения малярийных паразитов в отдаленных медпунктах [8].

Тем не менее у обоих тестов – RealAmp и MG-LAMP – были проблемы с выявлением низкоуровневой и смешанных инфекций, особенно при детекции *P. vivax* [9].

В настоящее время на рынке доступны 2 коммерческих набора для детекции малярии на основе LAMP: «LoopAmp malaria (Pan/Pf/Pv) detection kit» (Eiken Chemical Company, Япония) и «Alethia malaria» (Meridian Biosciences, США). Оба набора реагентов достаточно дорогие и имеют сложную систему пробоподготовки и регистрации результата. Чувствительность исследований с применением обоих наборов (нижний предел обнаружения) составляет ~1000 паразитов/мл, что не позволяет выявить часть бессимптомных пациентов, у которых уровень паразитов в крови может быть и меньше. Например, при обследовании бессимптомных пациентов в Занзибаре чувствительность исследования с набором LoopAmp составила лишь 40,8% [10]. Кроме того, «Alethia malaria» неспособен дифференцировать *P. vivax* и *P. falciparum* [6].

В Российской Федерации первый ПЦР-тест для диагностики малярии был разработан и зарегистрирован ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора в марте 2021 г. Набор реагентов «АмплиСенс® *Plasmodium* spp./*P.falciparum*/*P.vivax*-FL» обладает высокой аналитической чувствительностью (1–0,1 кл/мкл крови), что позволяет выявлять инфекцию даже при низком уровне инфицирования, а также в инкубационном и начальном периодах заболевания. При его применении снижается риск получения ложноположительных результатов, что нередко случалось при микроскопии мазков крови (старый золотой стандарт лабораторной диагностики малярии) [11]. Отечественного LAMP-

теста для выявления *P. vivax* не зарегистрировано. В то же время видоспецифическая диагностика возбудителя малярии имеет решающее значение для адекватного лечения. Немаловажную роль играет выбор мишени, особенно в отношении таких инфекционных заболеваний, как малярия. Стандартными молекулярными маркерами для дифференциации видов *Plasmodium* являются гены *18S* рРНК [12]. Для повышения чувствительности анализа предпочтительней использовать многокопийные геномные последовательности. Поэтому предлагалось использовать некодирующую повторяющуюся последовательность субтеломерной области хромосом *Pvr47*, которая имеется в 14 копиях в геноме *P. vivax* *Sal1* [13]. Хотя данная область оказалась вполне пригодной для конструирования ПЦР-праймеров, использование *Pvr47* для LAMP-анализа не увенчалось успехом – специфичность была невысокой и результаты не воспроизводились [7]. При попытках с помощью этих LAMP-праймеров обнаружить *P. vivax* в комарах *Anopheles* spp. были получены неспецифические сигналы [14].

Как одна из перспективных мишеней рассматривался многокопийный консервативный С-концевой участок семейства генов *vir*, но варибельность этих участков оказалась настолько высокой, что найти фрагмент ДНК-последовательности достаточной длины и консервативности для подбора праймеров не удалось [15].

В отличие от высоковариабельных повторяющихся областей генома и *vir*-генов митохондриальная ДНК (мтДНК) содержит очень консервативные участки и в то же время позволяет различить малярийных паразитов до вида. Важно и то, что мтДНК присутствует в геноме в нескольких копиях (30–100 копий в клетке) и, не являясь ядерной, легко экстрагируется кипячением [16]. Все это предопределило использование мтДНК *P. vivax* в качестве мишени при разработке LAMP-теста для обнаружения ДНК паразитов вида *P. vivax*.

Хотя LAMP-тесты имеют ряд преимуществ по сравнению с другими методами, при разработке необходимо учитывать некоторые ограничения петлевой изотермической амплификации, в частности, независимую от матрицы неспецифическую амплификацию, с которой ранее столкнулись ряд разработчиков диагностических тест-систем на основе LAMP.

Целью нашей работы является разработка чувствительного, специфичного и простого в применении LAMP-амплификационного теста для обнаружения ДНК паразитов вида *P. vivax* в крови человека с использованием мтДНК в качестве мишени.

Материалы и методы

Конструирование праймеров

При выборе олигонуклеотидных праймеров использовали online-программу для расчета праймеров на основе целых геномов GLAPD (<https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/online/>). Анализ формирования вторичных структур (димеров, шпиклек) выбранными праймерами проводили с помощью компьютерной программы mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) и Multiple Primer Analyzer ([https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/](https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/) [\[molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html\]\(http://molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html\)\). Структуры всех олигонуклеотидов сравнивались с помощью информационного ресурса NCBI BLAST \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>\) с последовательностями ДНК, размещенными в базе данных GenBank. При проведении этого анализа олигонуклеотиды с существенной гомологией с ДНК каких-либо других организмов исключали.](http://molecular-biology-learning-center/</p></div><div data-bbox=)

Проведение петлевой изотермической амплификации

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× SD-буфер («РусЭнзим», Россия), 40 ед. SD-полимеразы («РусЭнзим», Россия), 3,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ каждого дНТФ, 4 праймера: 0,2 мкМ F3, 0,2 мкМ B3, 1,6 мкМ BIP, 1,6 мкМ FIP, 0,6 мкМ красителя SYTO 82, 5 мкл матрицы.

Реакцию комбинированной амплификации проводили на приборе для проведения ПЦР-анализа с детекцией продукта в режиме реального времени Applied Biosystems 7500 (США) в следующем режиме: первичная денатурация: при температуре 92°C – 1 мин 45 с, далее 4 цикла: при температуре 92°C – 15 с, при температуре 63°C – 1 мин, затем амплификация при температуре 63°C в течение 20 мин со считыванием флуоресценции каждую минуту. Накопление специфического продукта амплификации – участка ДНК *P. vivax* – детектировали по каналу VIC.

Учет результатов петлевой изотермической амплификации проводили с помощью программного обеспечения Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems.

Микробиологические методы

В работе использовали бактерии из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Для проверки специфичности наборов праймеров использовали штаммы гетерологичных микроорганизмов: *Bacillus anthracis* 71/12, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Yersinia pseudotuberculosis* C79, *Yersinia enterocolitica* C-126, *Brucella abortus* 19 BA, *Brucella melitensis* 16-M, *Brucella suis* 1330, *Vibrio cholerae* P-19241, *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Работу с возбудителями особо опасных инфекционных заболеваний проводили в соответствии с санитарными правилами и нормами.

Ампулы с культурой *F. tularensis* вскрывали и вносили по 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлористого. После растворения микробные взвеси высевали на чашки Петри с FT-агаром (ФБУН ГНЦ ПМБ) и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 ± 1°C.

Ампулы с культурой *B. anthracis* вскрывали и вносили по 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлористого. После растворения микробные взвеси *B. anthracis* по 0,1 мл засеивали в пробирки с 5 мл бульона Хоттингера (рН 7,2 ± 0,1) и инкубировали в течение 18–24 ч при температуре 37 ± 1°C. Затем производили посев на чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2 ± 0,1) и инкубировали 18 ч при температуре 37 ± 1°C.

Ампулы с лиофилизированными культурами *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *E. coli* вскрывали и после растворения микробные взвеси по 0,1 мл засеивали на чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2) и инкубировали в

течение 18–24 ч при температуре 37°C для *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* и температуре 28°C для *Y. pestis*.

После растворения микробную взвесь *V. cholerae* в объеме 0,1 мл высевали в 1%-ю пептонную воду, инкубировали в течение 3–6 ч при температуре 37 ± 1°C. Затем производили высеив с помощью бактериальной петли на чашки Петри с щелочным агаром, инкубировали при температуре 37 ± 1°C в течение 18–20 ч.

Штаммы возбудителя бруцеллеза выращивали на бруцеллагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ). Культуры выращивали 48–72 ч при температуре 37 ± 1°C.

Штаммы возбудителя легионеллеза выращивали на питательной среде для культивирования легионелл – легионелбакагара (ФБУН ГНЦ ПМБ) при температуре 37 ± 1°C в присутствии 5% CO₂. Колонии образовывались на 3–5-й день инкубирования.

Из каждой культуры готовили отдельно суспензии в 2 мл 0,9%-го раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А.Тарасевича, что соответствует 1•10⁸ м.к./мл для *B. anthracis*, 1•10⁹ м.к./мл для *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Brucella*, *Legionella* и *E. coli*, 5•10⁹ м.к./мл для *F. tularensis*, 2,2•10⁹ м.к./мл для *V. cholerae*. Затем проводили десятикратные разведения подготовленных суспензий микроорганизмов в 0,9%-м растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1•10⁷ м.к./мл.

Для обеззараживания материала в пробирки с тестируемыми микробными взвесями в объеме 100 мкл добавляли 11 мкл 0,1%-го натрия мертиолята (разведение 1:1000) до конечной концентрации 0,01% (разведение 1:10000) и прогревали при температуре 56 ± 1°C в течение 30 мин. По истечении заданного времени в пробирки с бактериальными взвесями вносили по 300 мкл лизирующего раствора из набора реагентов «РИБО-преп» и прогревали при температуре 65+1°C в течение 5 мин. После этого пробы считали обеззараженными.

Экстракция тотальной ДНК исследуемых штаммов осуществлялась с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147 от 06.08.2021). Выделение ДНК осуществляли в соответствии с инструкцией производителя, начиная с этапа внесения сорбента.

Результаты

Выбор праймеров

В качестве целевой области для конструирования LAMP-праймеров была выбрана митохондриальная ДНК *P. vivax*, поскольку она является многокопийной. Online-ресурс GLAPD позволяет разработать олигонуклеотиды с высокой специфичностью на основе целых геномов. Для заданного целевого генома рассчитываются наборы праймеров, которые амплифицируют ДНК только этого генома [17]. С помощью GLAPD рассчитаны несколько наборов олигонуклеотидных праймеров для детекции возбудителя трехдневной малярии методом LAMP. В качестве целевой последовательности был выбран *P. vivax* mitochondrion RefSeq: NC_028626.1, в качестве фоновой – *P. falciparum* mitochondrion RefSeq: NC_037526.1.

Праймеры на *Plasmodium vivax*.

The 1 LAMP primers:
F3: pos:284,length:22 bp, primer(5'-3'):CCTGGTGTTTTAAATTAAGACG
F2: pos:306,length:21 bp, primer(5'-3'):CTGACTTCCTGGCTAAACCTC
F1c: pos:355,length:25 bp, primer(5'-3'):ACATGAATATAGACGGTTTTCTGCG
B1c: pos:393,length:25 bp, primer(5'-3'):AACCGCTAATTACGAATCTTCCAAG
B2: pos:436,length:23 bp, primer(5'-3'):CAGGAAAATTATAGACCGAACCT
B3: pos:469,length:25 bp, primer(5'-3'):CCATGAACATATAAAACATGTGATCT
The 2 LAMP primers:
F3: pos:639,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTTTTCGCGTTTTTTCAG
F2: pos:672,length:23 bp, primer(5'-3'):ATCGATGTTTTAAAATCTACGC
F1c: pos:731,length:24 bp, primer(5'-3'):GCTGCTGGAAGTAGAAATCGTTAT
B1c: pos:781,length:24 bp, primer(5'-3'):TGCTCAACTACCATGTTACGACTTC
B2: pos:828,length:18 bp, primer(5'-3'):CTTCTGATCGACTCGTG
B3: pos:852,length:22 bp, primer(5'-3'):CATGTTACGAGATTTAAGGAT
The 3 LAMP primers:
F3: pos:957,length:25 bp, primer(5'-3'):ATTCTATTTATTAGGAGTCTCACAC
F2: pos:995,length:18 bp, primer(5'-3'):GGAAGTCGTTACACCGTT
F1c: pos:1036,length:25 bp, primer(5'-3'):GGTCCTAAGGTAGCAAATTCCTTG
B1c: pos:1065,length:20 bp, primer(5'-3'):TACGATACAGCCGCGTTTA
B2: pos:1101,length:25 bp, primer(5'-3'):ATGAATAGTTCAAGTTACTGACATC
B3: pos:1136,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTACAACACAAGTCACTG
The 4 LAMP primers:
F3: pos:1362,length:18 bp, primer(5'-3'):CAGCCAACACCATCCAAT
F2: pos:1394,length:25 bp, primer(5'-3'):TCTGTGTACAATACATTTTTGATCC
F1c: pos:1446,length:25 bp, primer(5'-3'):GCATCTGTTTCTATTCTTTTGGGCT
B1c: pos:1492,length:25 bp, primer(5'-3'):AGACTATGACGCTATCAATTTGAC
B2: pos:1538,length:21 bp, primer(5'-3'):GAGGATGAACGTTAAGTTCT
B3: pos:1572,length:20 bp, primer(5'-3'):TTGTTCCCTATCTACCGTTT
The 5 LAMP primers:
F3: pos:1679,length:21 bp, primer(5'-3'):AGATTGTAAGGTATAGCGTT
F2: pos:1714,length:19 bp, primer(5'-3'):ACAATGTATTCCACCGCT
F1c: pos:1775,length:20 bp, primer(5'-3'):TCTTTGCCTGGAGTTACGT
B1c: pos:1796,length:21 bp, primer(5'-3'):AATGACCGGTCAAACCGAAT
B2: pos:1857,length:21 bp, primer(5'-3'):ATGACTATGCTCCATGCTAGT
B3: pos:1892,length:19 bp, primer(5'-3'):AGAAGGGAAGTGTGTTTCC
The 6 LAMP primers:
F3: pos:2948,length:19 bp, primer(5'-3'):TTTAGCGTGTATTGTTGCC
F2: pos:2982,length:25 bp, primer(5'-3'):CGTCACGCCAAATTTATATTACTAAG
F1c: pos:3025,length:25 bp, primer(5'-3'):GTTTCCATCTCAACTCTACAGGTTA
B1c: pos:3053,length:23 bp, primer(5'-3'):CCGAAAAGGAAATATTACGTTCCA
B2: pos:3101,length:22 bp, primer(5'-3'):CATTTTTAGTCCCATGCTAGT
B3: pos:3124,length:21 bp, primer(5'-3'):GGGCTTAAACCAACAACATAA
The 7 LAMP primers:
F3: pos:6427,length:22 bp, primer(5'-3'):CCTGGTGTTTTAAATTAAGACG
F2: pos:6449,length:21 bp, primer(5'-3'):CTGACTTCTCGCTAAACTTC
F1c: pos:6498,length:25 bp, primer(5'-3'):ACATGAATATAGACGGTTTTCTGCG
B1c: pos:6536,length:25 bp, primer(5'-3'):AACCGTAATTACGAATCTTCCAAG
B2: pos:6579,length:23 bp, primer(5'-3'):CAGGAAAATTATAGACCGAACCT
B3: pos:6612,length:25 bp, primer(5'-3'):CCATGAACATATAAAACATGTGATCT
The 8 LAMP primers:
F3: pos:6782,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTTTTCGCGTTTTTTCAG
F2: pos:6815,length:23 bp, primer(5'-3'):ATCGATGTTTTAAAATCTACGC
F1c: pos:6874,length:24 bp, primer(5'-3'):GCTGCTGGAAGTAGAAATCGTTAT
B1c: pos:6924,length:24 bp, primer(5'-3'):TGCTCAACTACCATGTTACGACTTC
B2: pos:6971,length:18 bp, primer(5'-3'):CTTCTGATCGACTCGTG
B3: pos:6995,length:22 bp, primer(5'-3'):CATGTTACGAGATTTAAGGAT
The 9 LAMP primers:
F3: pos:7100,length:25 bp, primer(5'-3'):ATTCTATTTATTAGGAGTCTCACAC
F2: pos:7138,length:18 bp, primer(5'-3'):GGAAGTCGTTACACCGTT
F1c: pos:7179,length:25 bp, primer(5'-3'):GGTCCTAAGGTAGCAAATTCCTTG
B1c: pos:7208,length:20 bp, primer(5'-3'):TACGATACAGCCGCGTTTA
B2: pos:7244,length:25 bp, primer(5'-3'):ATGAATAGTTCAAGTTACTGACATC
B3: pos:7279,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTACAACACAAGTCACTG
The 10 LAMP primers:
F3: pos:7505,length:18 bp, primer(5'-3'):CAGCCAACACCATCCAAT
F2: pos:7537,length:25 bp, primer(5'-3'):TCTGTGTACAATACATTTTTGATCC
F1c: pos:7589,length:25 bp, primer(5'-3'):GCATCTGTTTCTATTCTTTTGGGCT
B1c: pos:7635,length:25 bp, primer(5'-3'):AGAGCTATGACGCTATCAATTTGAC
B2: pos:7681,length:21 bp, primer(5'-3'):GAGGATGAACGTTAAGTTCT
B3: pos:7715,length:20 bp, primer(5'-3'):TTGTTCCCTATCTACCGTTT

При отборе праймеров были применены строгие критерии – олигонуклеотиды, образующие стойкие вторичные структуры, которые могут повлиять на эффективность амплификации, исключали. В результате самыми перспективными для проведения изотермической амплификации признаны наборы №2 и №3.

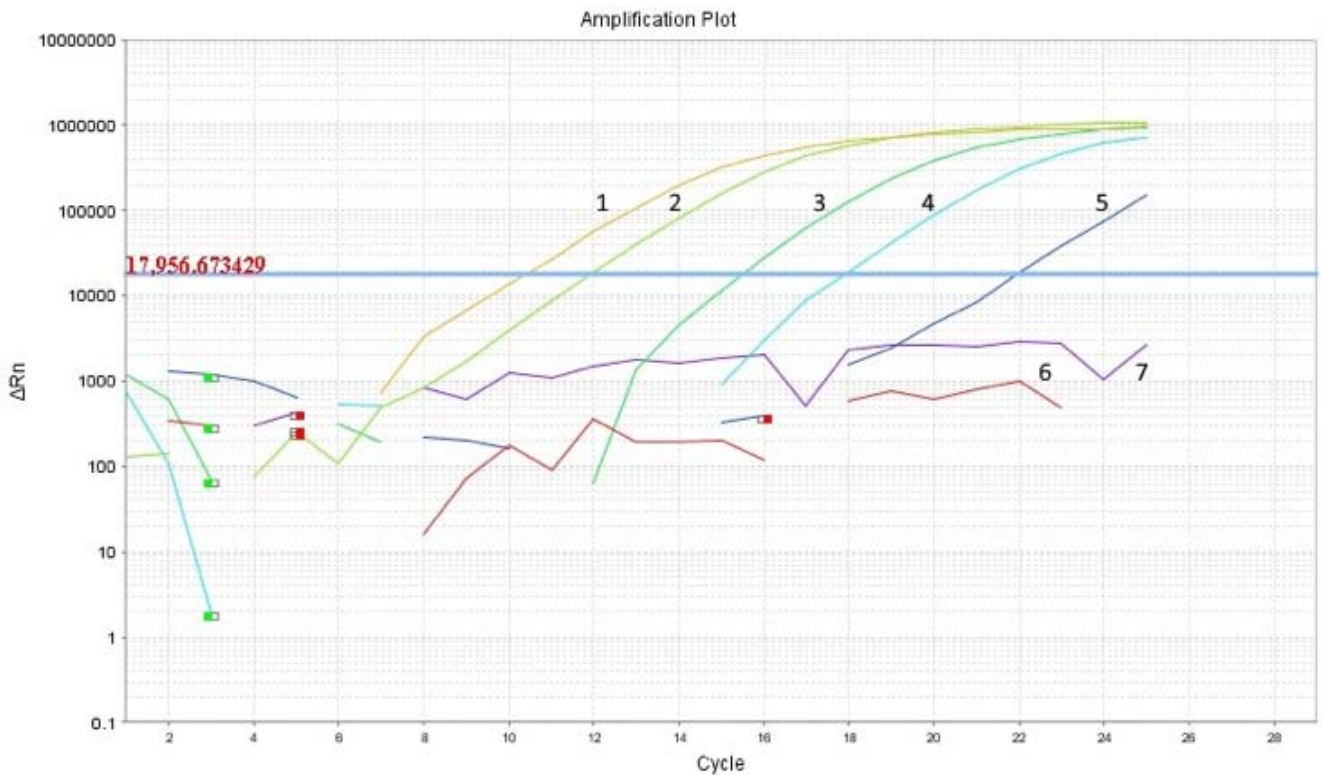


Рис. 1. Графики амплификации LAMP-продукта с помощью набора праймеров №2 с тестовой плазмидой pUC57-196 с фрагментом мтДНК *P. vivax*: 1 – 2 мг pUC57-196, 2 – 200 пг pUC57-196, 3 – 20 пг pUC57-196, 4 – 2 пг pUC57-196, 5 – 200 фг pUC57-196, 6 – 200 пг pUC57-Mal784 с фрагментом мтДНК *P. falciparum*, 7 – отрицательный контроль амплификации H₂O.
Fig. 1. Graphs of LAMP product amplification using primer set #2 with test plasmid pUC57-196 with a fragment of *P. vivax* mtDNA: 1 – 2 mg pUC57-196, 2 – 200 pg pUC57-196, 3 – 20 pg pUC57-196, 4 – 2 pg pUC57-196, 5 – 200 fg pUC57-196, 6 – 200 pg pUC57-Mal784 with a fragment of *P. falciparum* mtDNA, 7 – negative control of H₂O amplification.

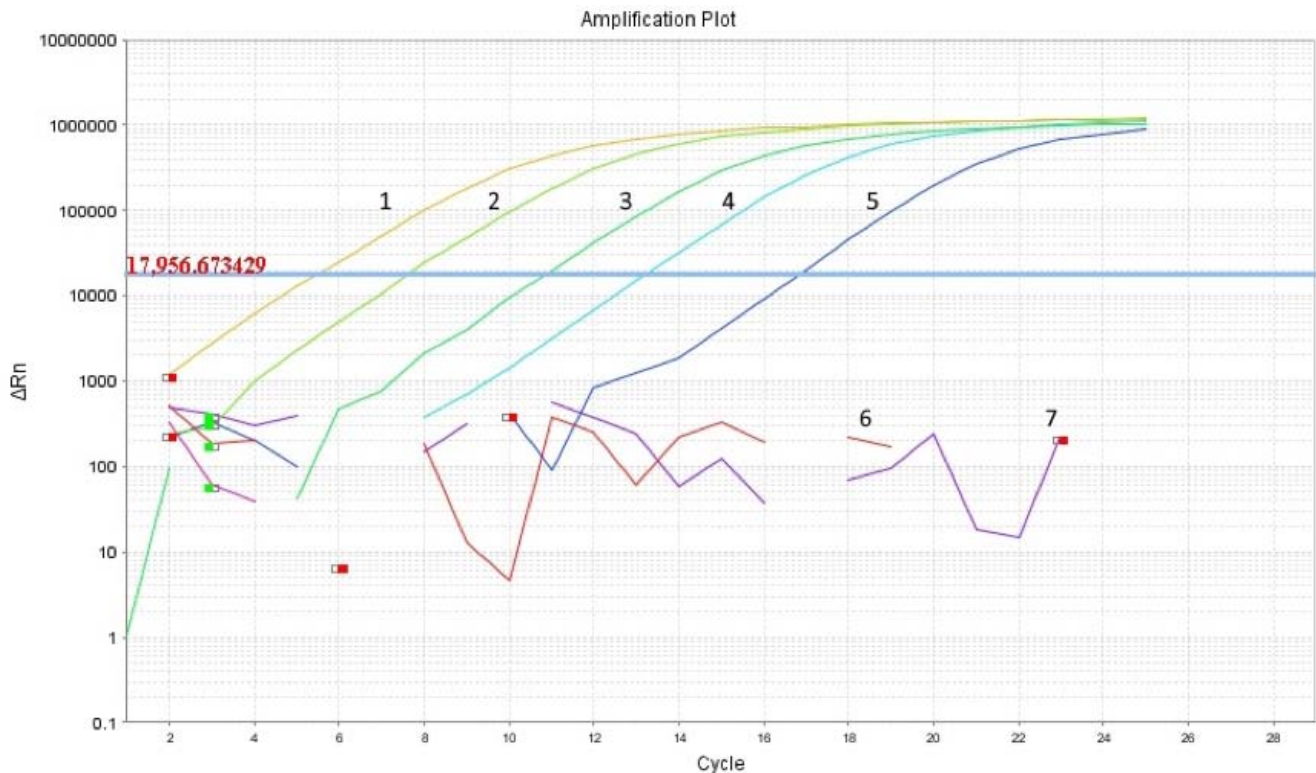


Рис. 2. Графики амплификации LAMP-продукта с помощью набора праймеров №3 с тестовой плазмидой pUC57-232 с фрагментом мтДНК *P. vivax*: 1 – 2 мг pUC57-232, 2 – 200 пг pUC57-232, 3 – 20 пг pUC57-232, 4 – 2 пг pUC57-232, 5 – 200 фг pUC57-232, 6 – 200 пг pUC57-Mal784 с фрагментом мтДНК *P. falciparum*, 7 – отрицательный контроль амплификации H₂O.
Fig. 2. Graphs of LAMP product amplification using primer set #3 with test plasmid pUC57-232 with a fragment of *P. vivax* mtDNA: 1 – 2 mg pUC57-232, 2 – 200 pg pUC57-232, 3 – 20 pg pUC57-232, 4 – 2 pg pUC57-232, 5 – 200 fg pUC57-232, 6 – 200 pg pUC57-Mal784 with a fragment of *P. falciparum* mtDNA, 7 – negative control of H₂O amplification.

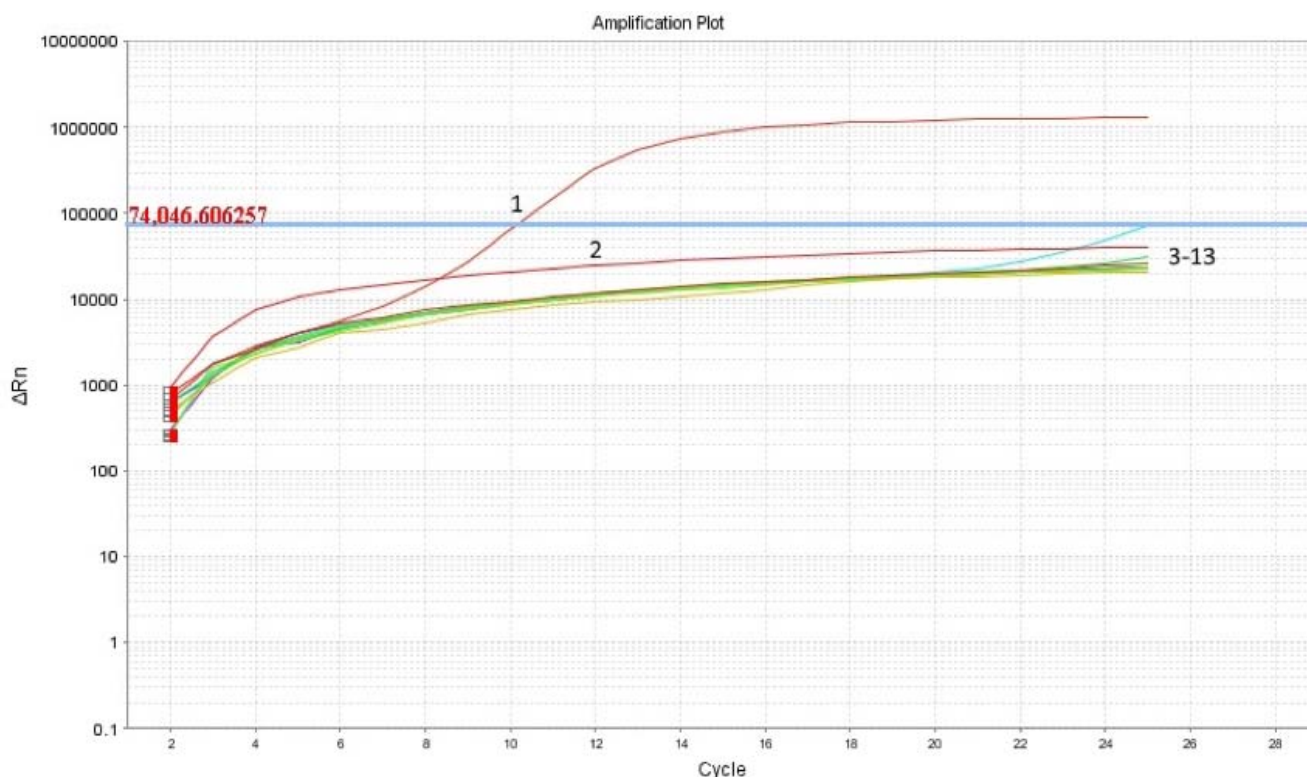


Рис. 3. Графики амплификации LAMP-продукта с помощью набора праймеров №2 с ДНК гетерологичных микроорганизмов: 1 – положительный контроль – плазмида pUC57-196 с фрагментом мтДНК *P. vivax*, 2 – отрицательный контроль амплификации H₂O, 3 – ДНК *B. anthracis* 71/12, 4 – ДНК *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 5 – ДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ, 6 – ДНК *Y. pseudotuberculosis* C79, 7 – ДНК *Y. enterocolitica* C-126, 8 – ДНК *B. abortus* 19 BA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – ДНК *B. suis* 1330, 11 – ДНК *V. cholerae* P-19241, 12 – ДНК *L. pneumophila* ATCC 33152, 13 – ДНК *E. coli* ATCC 25922.

Fig. 3. Graphs of LAMP product amplification using primer set No. 2 with DNA of heterologous microorganisms: 1 – positive control – plasmid pUC57-196 with mtDNA fragment of *P. vivax*, 2 – negative control of H₂O amplification, 3 – DNA of *B. anthracis* 71/12, 4 – DNA of *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 5 – DNA of *Y. pestis* EV НИИЭГ, 6 – DNA of *Y. pseudotuberculosis* C79, 7 – DNA of *Y. enterocolitica* C-126, 8 – DNA of *B. abortus* 19 BA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – DNA of *B. suis* 1330, 11 – DNA of *V. cholerae* P-19241, 12 – DNA of *L. pneumophila* ATCC 33152, 13 – DNA of *E. coli* ATCC 25922.

В работе также использовали SD-полимеразу – фермент-мутант Taq-полимеразы, обладающий способностью вытеснения цепи, но с более высокой термостабильностью по сравнению с Bst-полимеразой, что позволяет добавить этап первичной высокотемпературной денатурации ДНК, повышающий эффективность реакции [18]. При проведении анализа использовали комбинированную реакцию амплификации – сочетание 4 циклов ПЦР и собственно петлевую изотермическую амплификацию. Это позволило значительно сократить время анализа – синтез продукта был замечен уже через несколько минут от начала реакции. Использование Real-Time PCR Systems позволило следить за накоплением ампликонов в режиме реального времени без использования этапа электрофореза. В качестве положительного контроля использовали тестовые плазмиды pUC57 с клонированными участками митохондриальной ДНК *P. vivax* (ShineGene Molecular Biotech, Inc., Shanghai, Китай). Продукт амплификации получен только с контрольной ДНК, содержащей фрагмент мтДНК *P. vivax*. Оба набора праймеров (№2 и №3) показали воспроизводимые результаты при амплификации 10-кратных разведений тестовых плазмид. При этом чувствительность набора №3 оказалась несколько выше (рис. 1, 2). С ДНК гетерологичных микроорганизмов сигналов получено не было (рис. 3, 4).

Таким образом, в ходе конструирования тест-системы на основе изотермической амплификации удалось получить

2 набора видоспецифических олигонуклеотидов, направляющих синтез ДНК *P. vivax* только в присутствии специфической мишени – мтДНК *P. vivax*.

Обсуждение

В заключение следует отметить, что малярия, вызванная *P. vivax*, является распространенной формой этого заболевания, которое поражает людей во всем мире. Диагностика и лечение имеют важное значение для предотвращения осложнений, связанных с этим заболеванием, включая латентное течение малярии с обострениями, анемию, почечную недостаточность и даже летальный исход. LAMP является эффективным методом молекулярной диагностики, который можно использовать для высокочувствительного обнаружения таких патогенов, как *P. vivax*. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, но также выявлены и некоторые ограничения, которые следует учитывать при разработке теста и интерпретации результатов. Неспецифическая амплификация, независимая от матрицы, является существенной проблемой петлевой изотермической амплификации, что ранее было отмечено рядом авторов [19–21]. Она обусловлена использованием большого количества праймеров (4-6 праймеров на реакцию), два из которых являются чрезмерно длинными. Из-за амплификации димеров праймеров ложноположительные сигналы могут появиться в отрицательных

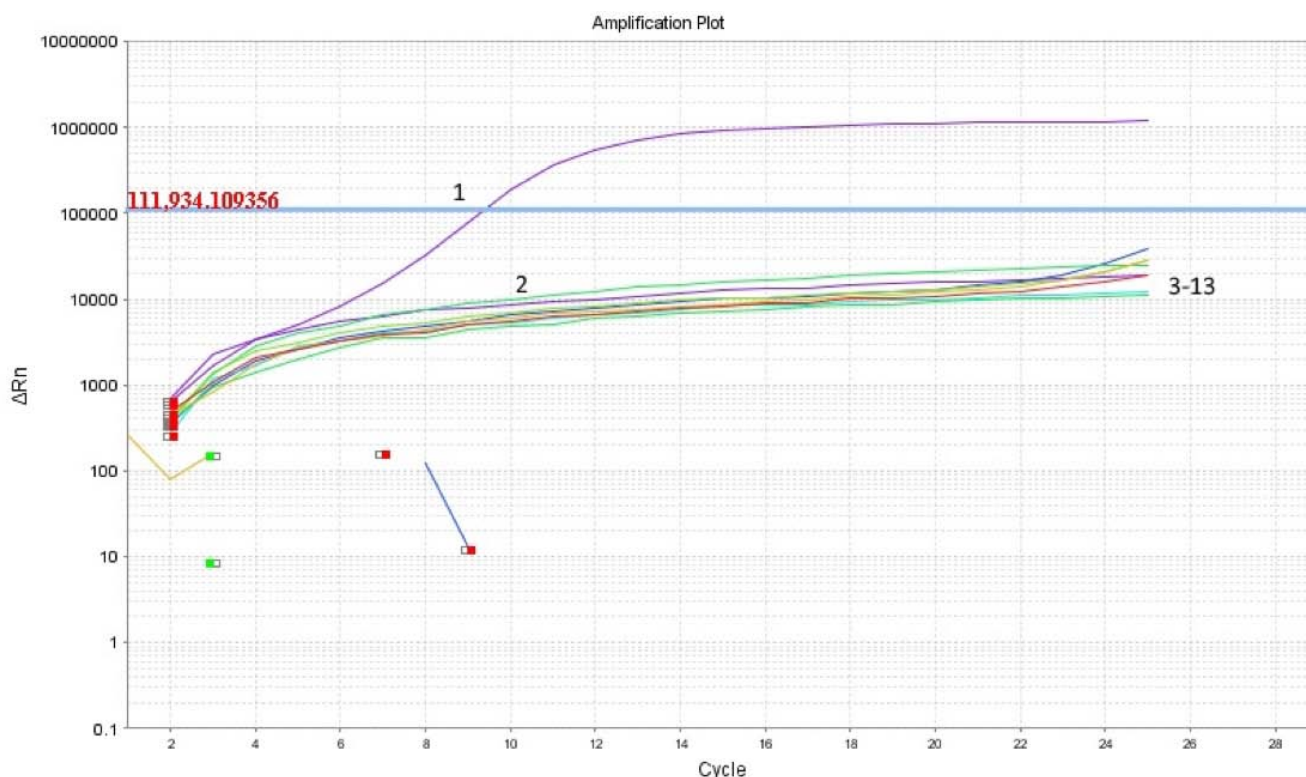


Рис. 4. Графики амплификации LAMP-продукта с помощью набора праймеров №3 с ДНК гетерологичных микроорганизмов: 1 – положительный контроль – плаزمида pUC57-232 с фрагментом мтДНК *P. vivax*, 2 – отрицательный контроль амплификации H₂O, 3 – ДНК *B. anthracis* 71/12, 4 – ДНК *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 5 – ДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ, 6 – ДНК *Y. pseudotuberculosis* C79, 7 – ДНК *Y. enterocolitica* C-126, 8 – ДНК *B. abortus* 19 BA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – ДНК *B. suis* 1330, 11 – ДНК *V. cholerae* P-19241, 12 – ДНК *L. pneumophila* ATCC 33152, 13 – ДНК *E. coli* ATCC 25922.

Fig. 4. Graphs of LAMP product amplification using primer set #3 with DNA of heterologous microorganisms: 1 – positive control – pUC57-232 plasmid with mtDNA fragment of *P. vivax*, 2 – negative control of H₂O amplification, 3 – *B. anthracis* 71/12 DNA, 4 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ DNA, 5 – *Y. pestis* EV НИИЭГ DNA, 6 – *Y. pseudotuberculosis* C79 DNA, 7 – *Y. enterocolitica* C-126 DNA, 8 – *B. abortus* 19 BA DNA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – *B. suis* 1330 DNA, 11 – *V. cholerae* P-19241 DNA, 12 – *L. pneumophila* DNA ATCC 33152, 13 – *E. coli* DNA ATCC 25922.

контролях, при этом их появление происходит случайным образом [22]. В итоге нет уверенности в результатах анализа, подобный тип амплификации невозможно отличить от контаминации реагентов. Более того, при сверхнизких концентрациях патогена на уровне предела обнаружения сложно доказать истинную позитивность образца [23]. Можно надеяться, что при разработке нашей тест-системы будут преодолены известные проблемы в виде неспецифической амплификации, ведущей к псевдоположительным результатам тестирования. Несомненно, что для оценки диагностической эффективности разработанной тест-системы необходимы дальнейшие исследования в различных клинических условиях, прежде чем ее можно будет широко применять в качестве инструмента для выявления возбудителя малярии *P. vivax*. Поэтому разработанные опытные образцы тест-систем планируется в ходе клинико-лабораторных исследований испытать на клинических пробах крови от заболевших малярией пациентов для завершения работ по созданию набора реагентов для LAMP-диагностики малярии, обусловленной *P. vivax*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. WHO. World malaria report 2022. 8 December 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>
2. Малярия: патогенез, клиника, эпидемиология и профилактика: учебное пособие. Под ред. Балахонова СВ. Иркутск: ИНЦХТ, 2019. / Malyariya: patogenez, klinika, epidemiologiya i profilaktika: uchebnoe posobie. Pod red. Balakhonova SV. Irkutsk: INTsKhT, 2019. (In Russian).
3. WHO. World Malaria Report 2021. 6 December 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>
4. 25 апреля – Всемирный день борьбы с малярией. 24.04.2023. / 25 aprelya – Vsemirnyi den' bor'by s malyariiei. 24.04.2023. Available at: https://02.rospotrebnadzor.ru/content/170/42003/?sphrase_id=166509 (In Russian).
5. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
6. Lucchi NW, Demas A, Narayanan J, Sumari D, Kabanyanyi A, Kachur SP, et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS One.* 2010 Oct 29;5(10):e13733. DOI: 10.1371/journal.pone.0013733
7. Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, DeBarry JD, Srinivasamoorthy G, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the

- species-specific identification of *Plasmodium vivax*. PLoS One. 2013;8(1):e54986. DOI: 10.1371/journal.pone.0054986
8. Kudyba HM, Louzada J, Ljolje D, Kudyba KA, Muralidharan V, Oliveira-Ferreira J, et al. Field evaluation of malaria malachite green loop-mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil. Malar J. 2019 Mar 25;18(1):98. DOI: 10.1186/s12936-019-2722-1
9. Barazorda KA, Salas CJ, Bishop DK, Lucchi N, Valdivia HO. Comparison of real time and malachite-green based loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. PLoS One. 2020 Jun 11;15(6):e0234263. DOI: 10.1371/journal.pone.0234263
10. Aydin-Schmidt B, Morris U, Ding XC, Jovel I, Msellem MI, Bergman D, et al. Field Evaluation of a High Throughput Loop Mediated Isothermal Amplification Test for the Detection of Asymptomatic *Plasmodium* Infections in Zanzibar. PLoS One. 2017 Jan 17;12(1):e0169037. DOI: 10.1371/journal.pone.0169037
11. О регистрации ПЦР-теста на выявление малярии. / O registratsii PTsR-testa na vyavlenie malyarii. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=17226 (In Russian).
12. Nguyen TK, Jun H, Louis JM, Mazigo E, Lee WJ, Youm HC, et al. Enhancing malaria detection in resource-limited areas: A high-performance colorimetric LAMP assay for *Plasmodium falciparum* screening. PLoS One. 2024 Feb 9;19(2):e0298087. DOI: 10.1371/journal.pone.0298087
13. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. J Clin Microbiol. 2011 Jul;49(7):2411-8. DOI: 10.1128/JCM.02603-10
14. Harrison GF, Foley DH, Rueda LM, Melanson VR, Wilkerson RC, Long LS, et al. *Plasmodium*-specific molecular assays produce uninterpretable results and non-*Plasmodium* spp. sequences in field-collected *Anopheles* vectors. Am J Trop Med Hyg. 2013 Dec;89(6):1117-1121. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0581
15. Auburn S, Böhme U, Steinbiss S, Trimarsanto H, Hostetler J, Sanders M, et al. A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of pir genes. Wellcome Open Res. 2016 Nov 15;1:4. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.9876.1
16. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2866-71. DOI: 10.1128/JCM.00355-10
17. Jia B, Li X, Liu W, Lu C, Lu X, Ma L, et al. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes. Front Microbiol. 2019 Dec 13;10:2860. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02860
18. Ignatov KB, Barsova EV, Fradkov AF, Blagodatskikh KA, Kramarova TV, Kramarov VM. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. Biotechniques. 2014 Aug 1;57(2):81-7. DOI: 10.2144/000114198
19. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. J Infect Dis. 2013 Aug 15;208(4):645-52. DOI: 10.1093/infdis/jit184
20. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. Biotechniques. 2012 Aug;53(2):81-9. DOI: 10.2144/0000113902
21. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malar J. 2015 Jan 28;14:43. DOI: 10.1186/s12936-015-0573-y
22. Katrak S, Murphy M, Nayebare P, Rek J, Smith M, Arinaitwe E, et al. Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Identification of Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infection in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2017 Dec;97(6):1777-1781. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0225
23. Gruenberg M, Moniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. Malar J. 2018 Jan 30;17(1):55. DOI: 10.1186/s12936-018-2201-0

Информация о соавторе:

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

Information about co-author:

Sergey F. Biketov, MD, PhD, Chief Researcher, of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Новые инструменты для разработки препаратов против *Acinetobacter*

Эргостерол, обнаруженный в грибах и некоторых мембранах простейших, изучен недостаточно по сравнению с холестерином из мембран животных. Обычно предполагается, что эргостерол модулирует мембраны таким же образом, как и холестерин, на основе их схожих химических структур. Раскрыты некоторые фундаментальные структурные и динамические различия между ними. Нейтронная дифракция показывает, что эргостерол встроен в липидный бислой гораздо глубже, чем холестерин. Эргостерол не изменяет толщину мембраны так сильно, как холестерин, что указывает на небольшой эффект конденсации. Нейтронное спиновое эхо показывает, что эргостерол может делать мембраны жесткими и смягчать их при разных концентрациях. Боковая диффузия липидов, измеренная с помощью квазиупругого рассеяния нейтронов, показывает, что эргостерол способствует скачкообразной диффузии липидов, тогда как холестерин сохраняет ту же непрерывную боковую диффузию, что и чистая липидная мембрана. Эти результаты указывают на совершенно разные взаимодействия эргостерола с мембранами по сравнению с холестерином. Эти идеи дают базовое понимание мембран, содержащих эргостерол, с учетом таких явлений, как липидные плоты и лекарственные взаимодействия.

Qian S, Nagy G, Zolnierczuk P, Mamontov E, Standaert R.

Nonstereotypical Distribution and Effect of Ergosterol in Lipid Membranes. J Phys Chem Lett. 2024 May 2;15(17):4745-4752. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.4c00385

Кандидатная вакцина на основе модифицированных липополисахаридов *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6 и Y безопасна и стимулирует секрецию специфических антител у добровольцев, результаты I фазы клинических исследований

В.А.Лёдов^{1,3}, М.А.Головина¹, Б.И.Алхазова¹, И.В.Анкудинов¹, П.А.Стряхнин¹, А.Л.Ковальчук², П.Г.Апарин¹

¹ООО «ГРИТВАК», Москва, Российская Федерация;

²ООО «НПФ "МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ"», Москва, Российская Федерация;

³ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины», Москва, Российская Федерация

Кандидатная вакцина против дизентерии Флекснера Флексвак® была разработана на основе эпидемически значимых штаммов *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y. В клиническое исследование были включены 25 добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет, случайным образом распределенные на 2 группы. В первые сутки наблюдения трижды через 2 ч они проходили медицинское обследование. Болезненности, образования инфильтратов, увеличения регионарных лимфоузлов выявлено не было за весь период наблюдения ни у одного из наблюдаемых лиц. У двух добровольцев, привитых препаратом Флексвак® дозой 125 мкг, было зарегистрировано незначительное покраснение в месте введения в течение 2 ч после инъекции. Общее самочувствие добровольцев после вакцинации – без изменений. Жалоб на недомогание, головную боль, тошноту, рвоту, боль в животе не предъявляли. По данным термометрии, измерения артериального давления, пульса отрицательной динамики не выявлено. Отклонений от норм биохимических и общих показателей крови не зарегистрировано, так же как и не зарегистрировано отклонений в цитокиновом статусе в первые часы после введения препарата. Через 21 день после первичной иммунизации препаратом Флексвак® дозой 62,5 мкг сероконверсия IgA, специфичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, была выявлена у 67; 75; 42; 42 и 50% добровольцев соответственно. Сероконверсия IgG, специфичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, была выявлена у 58; 58; 42; 33; 33% добровольцев соответственно. Сероконверсия IgM, специфичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, была выявлена у 25; 33; 8; 0; 8% добровольцев соответственно. С повышением дозы и кратности иммунизации существенных изменений в уровнях антител, специфичных к ЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, у добровольцев не установлено.

Ключевые слова: липополисахарид, *Shigella flexneri*

Для цитирования: Лёдов В.А., Головина М.А., Алхазова Б.И., Анкудинов И.В., Стряхнин П.А., Ковальчук А.Л., Апарин П.Г. Кандидатная вакцина на основе модифицированных липополисахаридов *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6 и Y безопасна и стимулирует секрецию специфических антител у добровольцев, результаты I фазы клинических исследований. Бактериология. 2024; 9(4): 49–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-49-55

A candidate vaccine based on modified lipopolysaccharides of *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6 and Y is safe and stimulates secretion of serotype-specific antibodies in volunteers, results of phase 1 clinical trial

V.A.Ledov^{1,3}, M.A.Golovina¹, B.I.Alkhazova¹, I.V.Ankudinov¹, P.A.Stryakhnin¹, A.L.Kovalchuk², P.G.Aparin¹

¹GRITVAK LLC, Moscow, Russian Federation;

²ООО "НПФ "МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ"" , Moscow, Russian Federation;

³Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation

Для корреспонденции:

Лёдов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, клинический директор ООО «ГРИТВАК», специалист во ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины»

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Телефон: (499) 617-0813

E-mail: ledov_va@sysbiomed.ru

Статья поступила 12.08.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Vladimir A. Ledov, MD, PhD, Clinical Director of GRITVAK LLC, Specialist at the Research Institute of Systems Biology and Medicine

Address: 24 Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russian Federation

Phone: (499) 617-0813

E-mail: ledov_va@sysbiomed.ru

The article was received 12.08.2024, accepted for publication 25.12.2024

A candidate vaccine against Flexner's dysentery, Flexvac[®], was developed on the basis of epidemically significant strains of *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y. The clinical trial included 25 volunteers aged 18 to 45 years, who were randomly divided into 2 groups. During the first day of observation, they underwent a medical examination every 2 hours, three times. Pain, induration at the injection site, or enlargement of regional lymph nodes were not detected during the entire observation period in any of the study participants. Two volunteers vaccinated with Flexvac[®] at a dose of 125 µg experienced slight redness at the injection site for 2 hours after vaccine administration. There was no change in the general well-being of the volunteers after vaccination. No complaints of malaise, headache, nausea, vomiting, or abdominal pain were recorded. According to thermometry, blood pressure and pulse measurements, no negative dynamics was detected. No deviations in biochemical and hematological parameters from normal values were registered, as well as no changes in the cytokine status were detected in the first hours after vaccine administration. 21 days after primary immunization with "Flexvac[®]" at a dose of 62.5 µg, seroconversion of IgA specific for *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y was detected in 67, 75, 42, 42, and 50% of volunteers, respectively. Seroconversion of IgG specific for *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y was detected in 58, 58, 42, 33, and 33% of volunteers, respectively. Seroconversion of IgM specific to *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y was detected in 25, 33, 8, 0, and 8% of volunteers, respectively. With increasing dose and frequency of immunization, no significant changes in the levels of antibodies specific to LPSs of *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y were revealed in volunteers.

Key words: lipopolysaccharide, *Shigella flexneri*

For citation: Ledov V.A., Golovina M.A., Alkhazova B.I., Ankudinov I.V., Stryakhnin P.A., Kovalchuk A.L., Aparin P.G. A candidate vaccine based on modified lipopolysaccharides of *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6 and Y is safe and stimulates secretion of serotype-specific antibodies in volunteers, results of phase 1 clinical trial. Bacteriology. 2024; 9(4): 49–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-49-55

Шигеллез является основной причиной воспалительных заболеваний кишечника в эндемичных регионах. Заболевание особенно опасно для детей, живущих в странах с низким и средним уровнем дохода, для беженцев, путешественников и дислоцированных военнослужащих [1–3]. Шигеллы распространяются фекально-орально, например через зараженную пищу и воду, а также при контакте от человека к человеку и имеют низкую инфекционную дозу, что делает их особенно контагиозными в условиях плохих санитарных условий и перенаселенности [4, 5]. От дизентерии ежегодно в мире погибает порядка 54 900 детей в возрасте до пяти лет, это ~50% смертей, связанных с диареей, в данной возрастной группе [6].

В Российской Федерации дизентерия остается одним из распространенных инфекционных заболеваний. Особую эпидемическую значимость дизентерия имеет для ограниченных коллективов, находящихся в условиях компактного проживания, путешественников, а также групп лиц, работающих в полевых условиях [7].

Около половины случаев дизентерии вызвано шигеллой Флекснера, причем подавляющее большинство зарегистрированных смертельных исходов обусловлено именно этим видом шигелл. Доминирующим возбудителем дизентерии Флекснера является *Shigella flexneri* 2a, минорные эпидемически значимые серотипы шигелл Флекснера: 1b, 3a, Y, 6, 4a [4]. Доля шигелл, устойчивых к антимикробной терапии, в мире варьирует в широком диапазоне и неуклонно возрастает. В некоторых регионах резистентность к ципрофлоксацину и цефтазидину достигает 100% [8]. На территории России устойчивость выделенных штаммов шигелл к сульфаниламидам составила 96%, к фторхинолонам – 53% [9].

Хотя шигеллы Флекснера являются важной составляющей эпидемий инфекционной диареи во всем мире, коммерческого вакцинного препарата против дизентерии Флекснера пока не разработано. Полисахаридным антигеном микроорганизма *S. flexneri* является липополисахарид (ЛПС), который локализован на внешней поверхности бактериальной клетки и является главным протективным антигеном шигелл [10]. При введении в макроорганизм ЛПС индуцирует высокий уровень специфических иммуноглобулинов, а также синтез провоспалительных цитокинов, фактора некроза

опухоли-α (ФНО-α) и интерферона-γ (ИФН-γ), т.е. является мощным бактериальным иммуностимулятором [11].

Одним из подходов к снижению уровня токсичности и пирогенности является контролируемая детоксикация ЛПС *S. flexneri* [12]. Нами была разработана кандидатная вакцина против заболеваний, связанных с шигеллами Флекснера серотипов 1b, 2a, 3a, 6, Y, – Флексвак[®]. Доклинические исследования кандидатной вакцины на лабораторных животных свидетельствовали о том, что препарат апиrogenен, безопасен, обладает выраженной иммуногенной активностью [13].

Целью данного исследования было изучить безопасность и иммуногенность вакцины Флексвак[®] с участием добровольцев в возрасте от 18 до 55 лет.

Материалы и методы

Вакцина

Активными компонентами вакцины Флексвак[®] являются модифицированные ЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, полученные методом контролируемой химической детоксикации [14].

Дизайн исследования и участники

Нами была проведена I фаза рандомизированного слепого исследования в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Центральная медико-санитарная часть №8 Федерального медико-биологического агентства России» (разрешение №432 от 14.10.2009). В исследовании приняли участие добровольцы (мужчины и женщины) в возрасте от 18 до 55 лет. Помимо основных критериев включения, подтверждающих хорошее физическое состояние добровольцев, проверяли также отсутствие в анамнезе и при лабораторном исследовании дизентерии Флекснера.



Рис. 1. Схема подкожной вакцинации и отбора проб.
Fig. 1. Scheme of subcutaneous vaccination and sampling.

Рандомизация добровольцев и ослепление образцов для исследований

Всего в исследование были включены 25 добровольцев (включая скрининг). Распределение по группам проводилось случайным образом независимо от возраста и пола (рис. 1). Полученные от добровольцев биоматериалы были зашифрованы для исследователя.

День 0 – забор венозной крови до иммунизации – скрининг 30 человек (общий анализ крови, биохимический анализ крови, определение уровня фоновых антител к ЛПС-антигенам *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y).

День 1 – забор венозной крови через 2, 4, 6 ч после первой иммунизации (цитокиновый профиль), через 6 ч после первой иммунизации – общий анализ крови, биохимический анализ крови.

День 21 – забор венозной крови через 21 день после первой иммунизации (общий анализ крови, биохимический анализ крови, специфический иммунный ответ к ЛПС-антигенам *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y).

День 51 – забор венозной крови через 30 дней после второй иммунизации (специфический иммунный ответ к ЛПС-антигенам *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y).

Безопасность и переносимость вакцины Флексвак®

После проведения вакцинации добровольцы находились под наблюдением врача на протяжении 5 дней. В первые сутки наблюдения они трижды, с интервалом 2 ч, проходили медицинское обследование. Любые выявленные нежелательные явления (НЯ) и серьезные нежелательные явления (СНЯ) записывались.

НЯ оценивали как общие и местные реакции организма. В структуре общих реакций подлежали учету температура тела, повышение артериального давления, учащение пульса, недомогание, головная боль, тошнота, рвота, жидкий стул, его кратность и консистенция, боль в животе и другие симптомы, а также клинические, биохимические анализы крови и цитокиновый профиль. Для оценки цитокинового профиля у добровольцев брали образец венозной крови через 2, 4 и 6 ч после первой иммунизации. Образцы крови для общего и биохимического анализов крови брали до вакцинации, через 6 ч после первой вакцинации и через 21 день после первой вакцинации. Из проявлений местной реакции учитывали болезненность, покраснение и припухлость в месте введения препаратов, возникновение инфильтратов и увеличение регионарных лимфоузлов. Также подлежали учету НЯ, не связанные с применением вакцины Флексвак®.

Любое неблагоприятное медицинское событие, которое вне зависимости от дозы лекарственного продукта привело к смерти, представляет собой угрозу для жизни, требует госпитализации или ее продления, привело к стойкой или значительной нетрудоспособности или инвалидности или представляет собой врожденную аномалию или дефект рождения, обозначали как СНЯ.

Оценка иммуногенности

Иммунный ответ на вакцинацию измеряли в образцах сыворотки добровольцев до вакцинации, через 21 день после первой вакцинации и через 30 дней после повторной вакцинации (рис. 1). Специфические антитела классов А, G,

М к шигеллам Флекснера 1b, 2a, 3a, 6, Y измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) описанным ранее [13].

Анализ данных

Иммуногенность вакцины оценивали по фактору сероконверсии (отношение среднего значения титра Ig после вакцинации к титру до вакцинации) и проценту добровольцев с более чем или равными 2- и 4-кратными приростами специфических антител.

Результаты исследования

Рандомизация

Всего в исследование были включены 25 добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет, случайным образом распределенные на 2 группы. В первые сутки наблюдения они трижды, с интервалом 2 ч, проходили медицинское обследование.

Безопасность и переносимость

Из местных постпрививочных реакций на вакцинацию у двух добровольцев, привитых вакциной Флексвак® 125 мкг, была зарегистрирована незначительная гиперемия в месте

Таблица 1. Местные реакции на введение вакцины Флексвак®
Table 1. Local reactions to the administration of the Flexvac® vaccine

Состояние привитых / The condition of the vaccinated	Вакцина Флексвак® (25 человек) / Vaccine Flexvac® (25 people)
Болезненность / Pain	0 (0%)*
Покраснение / Redness	2 (8%)
Инфильтраты / Infiltrates	0 (0%)
Увеличение регионарных лимфатических узлов / Enlargement of regional lymph nodes	0 (0%)

* в таблице приведено количество привитых, в скобках – процент от общего числа привитых.

* the table shows the number of vaccinated, in brackets – the percentage of the total number of vaccinated.

Таблица 2. Общие реакции организма на введение вакцины Флексвак®
Table 2. General reactions of the body to the administration of the Flexvac® vaccine

Состояние привитых / The condition of the vaccinated	Вакцина Флексвак® (25 человек) / Vaccine Flexvac® (25 people)
Повышение температуры >37,1°C / Temperature increase over 37.1°C	0 (%)*
Повышение артериального давления >140/100 мм рт. ст. / Increase in blood pressure over 140/100 mmHg	0 (%)
Ускорение пульса >90/мин / Pulse rate increases to more than 90 beats per minute	0 (%)
Тошнота / Nausea	0 (%)
Понос / Diarrhea	0 (%)
Головная боль / Headache	0 (%)
Боль в животе / Abdominal pain	0 (%)

* в таблице приведено количество привитых, в скобках – процент от общего числа привитых.

* the table shows the number of vaccinated, in brackets – the percentage of the total number of vaccinated.

Таблица 3. Цитокиновый профиль у добровольцев, привитых вакциной Флексвак®
Table 3. Cytokine profile in volunteers vaccinated with Flexvac® vaccine

Название препарата / Drug	Доза вакцины Флексвак® / Dose of Flexvac® vaccine	
	125 мкг (n = 13)	62,5 мкг (n = 12)
ФНО-α, пг/мл / TNF-α, pg/ml		
0 ч	11,2 ± 2,7	12,7 ± 2,2
2 ч	17,9 ± 5,4	17,7 ± 3,2
4 ч	13,5 ± 5,7	13,5 ± 0
6 ч	11,8 ± 0	19,9 ± 2,3
ИЛ-1β, пг/мл / IL-1β, pg/ml		
0 ч	0,005 ± 0,01	0
2 ч	0	0
4 ч	1,5 ± 0,8	0
6 ч	0	0
ИЛ-6, пг/мл / IL-6, pg/ml		
0 ч	1,3 ± 1,2	1,2 ± 0,8
2 ч	1,9 ± 2,4	0,7 ± 0,7
4 ч	6,1 ± 2,9	1,8 ± 1,1
6 ч	2,6 ± 0	2,8 ± 1,9
ИЛ-12, пг/мл / IL-12, pg/ml		
0 ч	110,4 ± 28,3	56,8 ± 30,4
2 ч	96,9 ± 25,8	49,9 ± 27,1
4 ч	138,4 ± 39,3	95,4 ± 34,5
6 ч	136,1 ± 0	63,6 ± 29,6
ИФН-γ, пг/мл / IFN-γ, pg/ml		
0 ч	2,3 ± 0,8	1,7 ± 1,1
2 ч	4,4 ± 0,7	3,1 ± 0,7
4 ч	3,7 ± 0,3	2,3 ± 0
6 ч	1,7 ± 0	3,1 ± 0,5
Кортизол, нмоль/л (норма 171–536 нмоль/л) / Cortisol, nmol/l (normal 171–536 nmol/l)		
0 ч	400,7 ± 129,8	367,2 ± 239,1
2 ч	411,2 ± 173,4	428,4 ± 106,8
4 ч	457,8 ± 81,8	234,2 ± 167,1
6 ч	192,7 ± 0	222 ± 156,7

введения препарата в верхней трети плеча в течение 2 ч после инъекции. Болезненности, покраснения, образования инфильтратов, увеличения регионарных лимфоузлов выявлено не было за весь период наблюдения ни у одного из наблюдаемых лиц (табл. 1).

Общее самочувствие добровольцев после вакцинации – без изменений. Жалоб на недомогание, головную боль, тошноту, рвоту, боль в животе не предъявляли. По данным инструментальных методов исследования отрицательной динамики не выявлено (табл. 2).

Продукция провоспалительных цитокинов

При изучении цитокинового статуса у добровольцев брали кровь из вены до введения исследуемого препарата Флексвак® (0 ч) и через 2, 4 и 6 ч после введения. Как видно из табл. 3, уровень провоспалительных цитокинов существенно не возрастает. Достигая пика, концентрация цитокинов не превышает базовый уровень (0 ч). Максимально концентрация ФНО-α, ИФН-γ возрастает через 2 ч, а интерлейкина-6 (ИЛ-6) и ИЛ-12 – через 4 ч после введения исследуемых препаратов, за исключением группы, иммунизированной 62,5 мкг, в этом случае пик ФНО-α и ИЛ-6 приходится на 6 ч после вакцинации. Концентрация ИЛ-1β практически не меняется (табл. 3).

Кровь для проведения общего и биохимического анализов брали у добровольцев до вакцинации, через 6 ч и через 21 сутки после вакцинации. Как видно по данным, представленным в табл. 4, 5, отклонений от норм биохимических и общих показателей крови не зарегистрировано.

При введении препарата Флексвак® в исследуемых дозах за весь 60-дневный период наблюдения СНЯ не зарегистрировано.

Иммуногенность

Иммуногенность вакцины Флексвак® оценивали как увеличение концентрации О-специфических анти-S. flexneri-антител в сыворотках крови добровольцев. Уровни антител определяли с использованием парных порций сывороток добровольцев, полученной от всех привитых до иммунизации, через 21 день после первичной иммунизации и через 30 дней после повторной иммунизации в тех же дозах. Вторичная иммунизация происходила через 21 день после первичной.

Фактор сероконверсии (ФС) IgA, специфичных к ЛПС S. flexneri 1b, у добровольцев, иммунизированных 62,5 мкг препарата Флексвак®, на 21-й день после первой иммунизации составил 4,2; специфичных к ЛПС S. flexneri 2a – 4,2; к S. flexneri 3a и 6 – по 2,4; к S. flexneri Y – 3,3. ФС IgG, специ-

Таблица 4. Биохимическое исследование крови у добровольцев, привитых вакциной Флексвак®
Table 4. Biochemical blood test in volunteers vaccinated with the Flexvac® vaccine

Показатели / Indicators	До вакцинации / Before vaccination	Через 6 ч / After 6 h	21 сутки / 21 days	Норма / Norm
АЛТ, Ед/л / ALT, U/L	21 ± 12	29 ± 17	17 ± 14	5–40
АСТ, Ед/л / AST, U/L	24 ± 14	31 ± 16	19 ± 12	5–40
Креатинин, мкмоль/л / Creatinine, μmol/L	108 ± 22	119 ± 20	113 ± 17	70–130
Мочевина, моль/л / Urea, mol/L	4,6 ± 3,1	4,7 ± 4,1	3,9 ± 2,8	3,38–8,32
Мочевая кислота, мкмоль/л / Uric acid, μmol/L	325 ± 128	340 ± 142	290 ± 118	240–500
Глюкоза, моль/л / Glucose, mol/L	4,6 ± 3,5	5,1 ± 4,2	4,1 ± 3,8	3,5–6,1

АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза.

Таблица 5. **Общий анализ крови у добровольцев, привитых вакциной Флексвак®**
 Table 5. **Complete blood count in volunteers vaccinated with Flexvac® vaccine**

Показатели / Indicators	До вакцинации / Before vaccination	Через 6 ч / After 6 h	21 сутки / 21 days	Норма / Norm
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ / Erythrocytes, $\times 10^{12}/l$	5,0 \pm 0,6	4,9 \pm 0,4	4,7 \pm 0,7	4,5–5,0
Гемоглобин, г/л / Hemoglobin, g/l	159 \pm 24	154 \pm 28	142 \pm 33	13–160
Цветовой показатель / Color index	0,97 \pm 0,05	0,96 \pm 0,06	0,96 \pm 0,06	0,9–1,1
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ / Leukocytes, $\times 10^9/l$	5,6 \pm 1,2	5,8 \pm 1,4	9,0 \pm 3,2	4,5–9,5
Сегментоядерные нейтрофилы, % / Segmented neutrophils, %	69 \pm 11	71 \pm 3	70 \pm 5	50–72
Лимфоциты, % / Lymphocytes, %	26 \pm 14	23 \pm 15	25 \pm 17	18–38
Моноциты, % / Monocytes, %	5 \pm 2	5 \pm 2	7 \pm 2	2–10
СОЭ, мм/ч / ESR, mm/h	4 \pm 2	3 \pm 2	3 \pm 2	1–5

СОЭ – скорость оседания эритроцитов.

фичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, составил 4; 4,2; 2,2; 2,5; 5,7 соответственно. ФС IgM, специфичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, составил 2; 2; 1,7; 2; 1,5 соответственно. Существенной разницы в количестве антител между группами, иммунизированными 62,5 мкг и 125 мкг, не выявлено. Повторная иммунизация также не привела к увеличению титра специфических антител (рис. 2).

Через 21 день после первичной иммунизации 62,5 мкг препарата Флексвак® сероконверсия ≥ 4 IgA, специфичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, была выявлена у 67, 75, 42, 42 и 50% добровольцев соответственно. Сероконверсия ≥ 4 IgG, специфичных к *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, выявлена у 58, 58, 42, 33, 33%; сероконверсия ≥ 4 IgM – у 25, 33, 8, 0, 8% добровольцев соответственно. С повышением дозы и кратности иммунизации существенных отличий в сероконверсии специфичных к ЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y антител у добровольцев не выявлено (табл. 6).

Обсуждение

В настоящее время в мире нет зарегистрированных вакцин против дизентерии Флекснера. Разработка вакцин затруднена по причине отсутствия доступной модели заболевания на животных, ограниченного понимания механизмов защиты или отсутствия коммерческого интереса. Тем не менее активно изучаются многочисленные стратегии получения дизентерийных вакцин, включая живые ослабленные пероральные, убитые пероральные и субъединичные парентеральные вакцины [15, 16]. Важность разработки шигеллезной вакцины регулярно подчеркивает Всемирная организация здравоохранения [17].

В ходе клинического исследования вакцины Флексвак® в дозах 62,5 мкг и 125 мкг нами не было зарегистрировано СНЯ и других значимых НЯ, которые были расценены как имеющие особый интерес вследствие их клинической значимости. В общей сложности в период исследования было зарегистрировано 2 НЯ (у 2 из 30 добровольцев). Не было выявлено отклонений от норм в общем и биохимическом анализе крови, а также при оценке цитокинового профиля при введении исследуемых доз 62,5 мкг и 125 мкг препарата Флексвак® за весь 21-дневный период наблюдения.

Следует отметить, что в ходе клинических исследований у одного из успешных вакцинных кандидатов против шигеллеза – 4-компонентной везикулярной GMMA-вакцины

(Generalized Modules for Membrane Antigens), содержащей OMV-частицы (outer membrane vesicles), включающие в состав генетически детоксифицированный ЛПС *S. flexneri*, уже на дозе 100 мкг при интраназальной иммунизации у каждого шестого добровольца была зафиксирована нейтропения и еще чаще ринорея [18, 19]. В рамках исследований I фазы

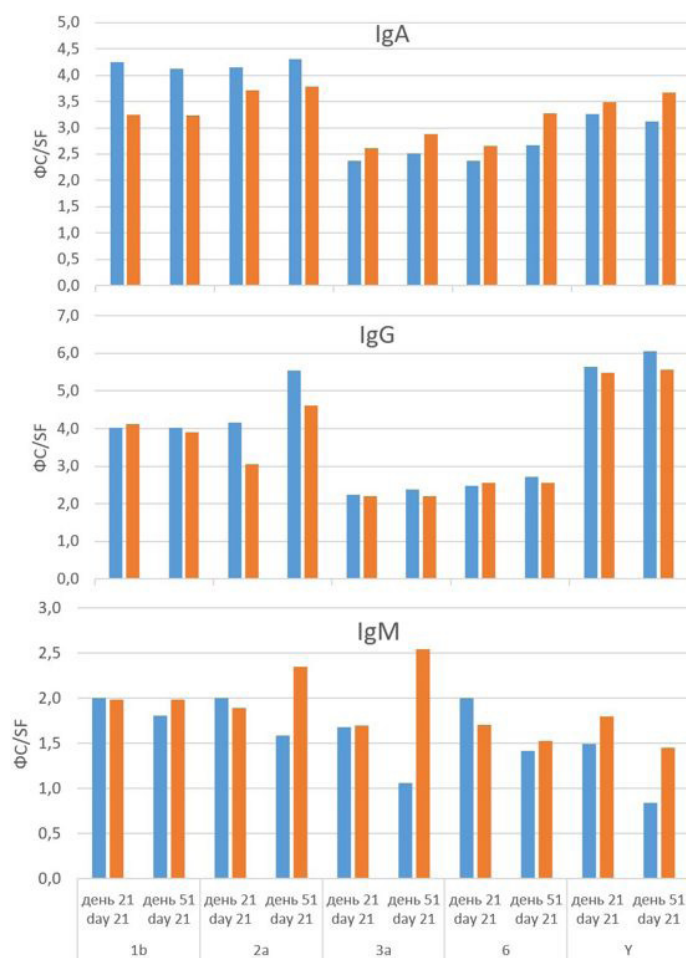


Рис. 2. **Фактор сероконверсии специфических IgA, IgG, IgM в сыворотке крови добровольцев на 21-й и 51-й день (30 дней после повторной) иммунизации препаратом Флексвак® в дозах:** ■ – 62,5 мкг, ■ – 125 мкг. ФС – фактор сероконверсии.

Fig. 2. **Seroconversion factor of specific IgA, IgG, IgM in the blood serum of volunteers on days 21 and 51 (30 days after repeated) immunization, immunized with the drug Flexvac® in doses:** ■ – 62.5 mcg, ■ – 125 mcg. SF – seroconversion factor.

Таблица 6. Процент добровольцев, иммунизированных вакциной Флексвак®, с ≥2- и ≥4-кратными приростами специфических антител на 21-й день после первичной иммунизации и на 51-й день (30 дней после повторной иммунизации)

Table 6. Percentage of volunteers immunized with Flexvac® vaccine with ≥2- and ≥4-fold increases in specific antibodies at 21 days post-primary immunization and at 51 days (30 days post-boost)

		62,5 мкг (n = 12)				125 мкг (n = 13)			
		21-й день / day 21		51-й день / day 51		21-й день / day 21		51-й день / day 51	
		≥2 (%)	≥4 (%)	≥2 (%)	≥4 (%)	≥2 (%)	≥4 (%)	≥2 (%)	≥4 (%)
1b	IgA	75	67	75	58	77	54	85	54
	IgG	75	58	75	58	92	54	92	54
	IgM	67	25	42	17	69	38	69	46
2a	IgA	92	75	92	67	77	54	77	61,5
	IgG	75	58	100	75	85	69	92	77
	IgM	50	33	50	25	61,5	31	69	46
3a	IgA	67	42	75	42	77	54	77	61,5
	IgG	67	42	75	42	100	69	100	69
	IgM	67	8	17	0	69	23	69	23
6	IgA	75	42	83	58	92	54	77	46
	IgG	67	33	75	42	85	54	100	69
	IgM	50	0	42	25	54	15	31	15
Y	IgA	83	50	75	50	92	38	69	54
	IgG	67	33	83	42	100	54	100	61,5
	IgM	58	8	58	0	69	15	54	23

GMMA-вакцины отмечены подъемы температуры до 38°C у 6,9% привитых, головные боли, а также боли в месте введения вакцины, в т.ч. высокой интенсивности [20].

ЛПС *S. flexneri* является одним из самых эндотоксичных ЛПС энтеробактерий. Его генетическая детоксикация посредством введения мутаций генов поздних ацетилтрансфераз (*msbB*, *htrB*) не может быть признана удовлетворительной.

Получаемые рекомбинантные штаммы-продуценты шигелл в значительных количествах синтезируют достаточно эндотоксичные пента- и тетра-ацильные формы ЛПС [21]. В вакцине Флексвак® используются три-ацильные формы, обладающие низкой эндотоксичностью, что позволяет вакцине иметь высокий уровень безопасности без снижения иммуногенности.

Иммунизация вакциной приводила к запуску О-специфического протективного гуморального иммунного ответа, высокой сероконверсии специфических антител IgA и IgG. Особо следует отметить выраженную индукцию у привитых анти-О антител класса IgA, играющих ключевую роль в протективном иммунитете против дизентерии.

Отсутствие выраженного вторичного иммунного ответа и низкие титры антител IgM являются следствием предсуществующего иммунного ответа к мажорному антигену шигелл. Вторичный иммунный ответ также не зарегистрирован у добровольцев при иммунизации антигенами 4-компонентной везикулярной GMMA-вакцины [20].

Отдельный интерес представляют данные по сравнительной иммуногенности для человека антигенов вакцины в за-

висимости от серотипа О-антигена молекулы модифицированного ЛПС. Хотя все антигены вакцины являются иммуногенными, иммунный ответ (особенно IgA) на серотипы О-антигенов *S. flexneri* 1b, 2a, Y является более высоким, чем на серотипы 3a, 6. По-видимому, это связано с особенностями структуры О-антигенных детерминант 3a, 6. Однако иммунный ответ добровольцев к 1b антигену 4-компонентной везикулярной GMMA-вакцины является низким, и различия в иммуногенности по сравнению с серотипом 2a являются существенными. Это свидетельствует о неэффективной форме представления антигена. Авторы предполагают возможный запуск механизмов интерференции антигенов (межмолекулярной антигенной конкуренции) вследствие использования общего везикулярного носителя OMV [20].

Таким образом, использование три-ацильной формы ЛПС как базового антигена вакцины позволяет получать безопасные и иммунологически активные вакцинные антигены вне зависимости от серотипического варианта шигеллы Флекснера.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Kotloff KL, Platts-Mills JA, Nasrin D, Roose A, Blackwelder WC, Levine MM. Global burden of diarrheal diseases among children in developing countries: Incidence, etiology, and insights from new molecular diagnostic techniques. *Vaccine*. 2017 Dec 14;35(49 Pt A):6783-6789. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.07.036
- Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Apr;80(4):609-14.
- Porter CK, Olson S, Hall A, Riddle MS. Travelers' Diarrhea: An Update on the Incidence, Etiology, and Risk in Military Deployments and Similar Travel Populations. *Mil Med*. 2017 Sep;182(S2):4-10. DOI: 10.7205/MILMED-D-17-00064
- Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*. 1999;77(8):651-66.
- Porter CK, Thura N, Ranallo RT, Riddle MS. The *Shigella* human challenge model. *Epidemiol Infect*. 2013;141(2):223-32.
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*. 2017 Sep;17(9):909-948. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30276-1
- Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. *Lancet*. 2018 Feb 24;391(10122):801-812. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33296-8
- Jonas MC, Etienne N, Tarcisse BN, Rachel M, Jolivet MML, Faly SMA, et al. Antibiotic Resistance Profile of Pathogenic Bacteria Isolated from "Mabokes" Smothered Fish in Brazzaville, Congo. *J Biosci Med*. 2020;08(08):138-48.
- Fazul'zyanova AI, Tkacheva SV, Sagitova AS, Rakhmanova OA. Antibiotic resistance of prevalent *Salmonella* and *Shigella* strains. *Pract Med*. 2020;18(4):88-90.

10. Wahid R, Simon JK, Picking WL, Kotloff KL, Levine MM, Sztein MB. *Shigella* antigen-specific B memory cells are associated with decreased disease severity in subjects challenged with wild-type *Shigella flexneri* 2a. *Clin Immunol*. 2013 Jul;148(1):35-43. DOI: 10.1016/j.clim.2013.03.009
11. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol*. 2007 Sep;297(5):353-63. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.04.001
12. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019 Feb 14;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
13. Ledov VA, Golovina ME, Alkhazova BI, Lvov VL, Kovalchuk AL, Aparin PG. A Pentavalent *Shigella flexneri* LPS-Based Vaccine Candidate Is Safe and Immunogenic in Animal Models. *Vaccines (Basel)*. 2023 Feb 3;11(2):345. DOI: 10.3390/vaccines11020345
14. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019 Feb 14;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
15. Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB, Fasano A, Kotloff KL, Levine MM. Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Apr;10(4):245-55. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.12
16. Mani S, Wierzbica T, Walker RI. Status of vaccine research and development for *Shigella*. *Vaccine*. 2016 Jun 3;34(26):2887-2894. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.02.075
17. Product WHO, For C. Vaccines against *Shigella*.
18. Micoli F, Nakakana UN, Berlanda Scorza F. Towards a Four-Component GMMA-Based Vaccine against *Shigella*. *Vaccines (Basel)*. 2022 Feb 18;10(2):328. DOI: 10.3390/vaccines10020328
19. Muturi-Kioi V, Lewis D, Launay O, Leroux-Roels G, Anemona A, Loulergue P, et al. Neutropenia as an Adverse Event following Vaccination: Results from Randomized Clinical Trials in Healthy Adults and Systematic Review. *PLoS One*. 2016 Aug 4;11(8):e0157385. DOI: 10.1371/journal.pone.0157385
20. Leroux-Roels I, Maes C, Mancini F, Jacobs B, Sarakinou E, Alhatemi A, et al.; *Shigella* Project Team. Safety and Immunogenicity of a 4-Component Generalized Modules for Membrane Antigens *Shigella* Vaccine in Healthy European Adults: Randomized, Phase 1/2 Study. *J Infect Dis*. 2024 Oct 16;230(4):e971-e984. DOI: 10.1093/infdis/jiae273
21. Rossi O, Pesce I, Giannelli C, Aprea S, Caboni M, Citiulo F, et al. Modulation of endotoxicity of *Shigella* Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA) by genetic lipid A modifications: Relative activation of TLR4 and TLR2 pathways in different mutants. *J Biol Chem*. 2014 Sep 5;289(36):24922-35. DOI: 10.1074/jbc.M114.566570

Информация о соавторах:

Головина Марина Эдуардовна, кандидат биологических наук, исполнительный директор ООО «ГРИТВАК»

Алхазова Биана Игоревна, оператор, ООО «ГРИТВАК»

Анкудинов Игорь Веналиевич, кандидат биологических наук, главный бухгалтер ООО «ГРИТВАК»

Стряхнин Пётр Алексеевич, химик-оператор, ООО «ГРИТВАК»

Ковальчук Александр Леонидович, кандидат медицинских наук, главный научный сотрудник ООО «НПФ "МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ"»

Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, генеральный директор ООО «ГРИТВАК»

Information about co-authors:

Marina E. Golovina, PhD in Biological Sciences, executive director, GRITVAK LLC

Biana I. Alkhazova, operator, GRITVAK LLC

Igor V. Ankudinov, PhD in Biological Sciences, chief accountant, GRITVAK LLC

Petr A. Stryakhnin, chemist-operator, GRITVAK LLC

Alexander L. Kovalchuk, MD, PhD, Chief Researcher, NPF MATERIA MEDICA HOLDING LLC

Petr G. Aparin, MD, PhD, DSc, General Director, GRITVAK LLC

НОВОСТИ НАУКИ**Искусственный интеллект точно отображает метаболизм клеток**

Омиксные технологии представляют собой изысканный комплекс самых современных научных средств, вобравший в себя геномику, транскриптомику, протеомику и метаболомику. Благодаря выдающимся достижениям в биологии, молекулярной генетике и биоинформатике, эти технологии открыли новые горизонты для изучения организмов на различных уровнях, начиная с глубинного – уровня ДНК. Теперь возможно выявлять мутации в ДНК, исследовать их влияние на экспрессию генов и продукцию белков, а также анализировать взаимодействие этих белков в дальнейшем.

Создание обширных наборов данных омики стало повседневной практикой для получения информации о клеточных процессах, однако расшифровка этих данных с целью определения метаболических состояний по-прежнему представляет собой сложное испытание. Кинетические модели могут интегрировать данные омики, связывая концентрации метаболитов, метаболические потоки и уровни ферментов. Тем не менее, определение кинетических параметров, определяющих клеточную физиологию, создает значительные барьеры для применения этих математических моделей. В этом контексте предлагается структура RENAISSANCE – генеративная модель машинного обучения, оптимизирующая параметризацию крупномасштабных кинетических моделей с динамическими свойствами, отражающими экспериментальные данные. Благодаря безупречной интеграции информации из различных источников, включая состав внеклеточной среды и опыт специалистов, RENAISSANCE точно фиксирует метаболические состояния в *Escherichia coli*, уменьшая неопределенность параметров и повышая точность, что будет крайне полезно в области здравоохранения и биотехнологии.

Choudhury S, Narayanan B, Moret M, Hatzimanikatis V, Miskovic L.

Generative machine learning produces kinetic models that accurately characterize intracellular metabolic states.

Nat Catal. 2024;7(10):1086-1098. DOI: 10.1038/s41929-024-01220-6

Изучение диагностической информативности выявления *Helicobacter pylori* у человека иммунохроматографическим методом

С.Г.Марданлы^{1,2}, С.В.Ротанов^{1,3}, Ю.А.Акиншина¹, М.А.Ханина²

¹АО «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Российская Федерация;

³ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Представлены результаты изучения показателей диагностической информативности исследований по выявлению *Helicobacter pylori* в образцах кала у людей с воспалительными заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки с применением набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген», основанном на принципах теста латерального потока (lateral flow test/LFT) или иммунохроматографического анализа. Установлены высокие показатели диагностической информативности разработанной тест-системы.

Ключевые слова: клиническая микробиология, *Helicobacter pylori*, диагностическая информативность, иммунохроматография, образцы кала

Для цитирования: Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Акиншина Ю.А., Ханина М.А. Изучение диагностической информативности выявления *Helicobacter pylori* у человека иммунохроматографическим методом. Бактериология. 2024; 9(4): 56–63. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-56-63

The study the diagnostic informativeness of the detection of *Helicobacter pylori* in humans by immunochromatographic method

S.G.Mardanly^{1,2}, S.V.Rotantov¹, Yu.A.Akinshina¹, M.A.Khanina²

¹JSC «EKOlal», Elektrogorsk, Russian Federation;

²State Humanitarian and Technological University, Orekhovo-Zuyev, Russian Federation;

³State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The results of studying the indicators of diagnostic information content of studies on the detection of *Helicobacter pylori* in fecal samples from people with inflammatory diseases of the stomach and duodenum using a kit of reagents “IHA-Helico-antigen” based on the principles of lateral flow test (LFT) or immunochromatographic analysis. The high diagnostic information content of the developed test system has been established.

Key words: clinical microbiology, *Helicobacter pylori*, diagnostic informative content, immunochromatography, stool samples

For citation: Mardanly S.G., Rotantov S.V., Akinshina Yu.A., Khanina M.A. The study the diagnostic informativeness of the detection of *Helicobacter pylori* in humans by immunochromatographic method. Bacteriology. 2024; 9(4): 56–63. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-56-63

Для корреспонденции

Ротанов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, научный консультант отдела перспективных разработок АО «ЭКОлаб»; ведущий научный сотрудник отдела информационных технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 111399, Москва, ул. Новогиреевская, 22-52

Статья поступила 22.03.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Sergey V. Rotantov, MD, PhD, DSc, Associate Professor, scientific consultant of the department of advanced developments JSC “EKOlal”; Leading Researcher, Department of Information Technologies, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 22-52 Novogireevskaya str., Moscow, 111399, Russian Federation

The article was received 22.03.2024, accepted for publication 25.12.2024

В соответствии с данными официальной статистической отчетности Роспотребнадзора у населения Российской Федерации в 2022 г. было выявлено 1211 новых случаев заболевания язвенной болезнью (ЯБ) желудка и двенадцатиперстной кишки, что составляет 49,4 случая на 100 000 населения [1]. Указанная патология широко распространена во всех странах мира, она чаще наблюдается у взрослого населения (с частотой 5–10%), максимум заболеваемости приходится на возраст 35–60 лет. Показатели заболеваемости ЯБ выше у жителей городов, нежели чем у сельских жителей; при этом исследователи расходятся в мнении о гендерных различиях в частоте выявлении ЯБ у мужчин и женщин. Отмечается более высокая заболеваемость населения ЯБ в развивающихся странах и социальных группах с низким уровнем материального обеспечения [2, 3].

ЯБ представляет собой хроническое заболевание, протекающее с чередованием периодов обострения (в весенние и осенние месяцы) и ремиссии; основное клиническое проявление болезни – болевой синдром и диспепсии из-за воспалительных изменений и образования язвенных дефектов на слизистой оболочке стенки желудка и/или двенадцатиперстной кишки.

По современным представлениям, в развитии воспалительных изменений слизистой оболочки при ЯБ важную, если не определяющую, роль играет инфицирование человека *Helicobacter pylori*. ~60% взрослого населения в мире (>3 млрд человек) поражено этим патогеном. При проведении эндоскопических исследований у населения в развивающихся странах эта спиралевидная бактерия часто выявляется уже в детском возрасте, а к середине жизни инфицированность достигает 90–95%. В России носительство *H. pylori* составляет от 60,7 до 100% [2, 3].

Учет клинических случаев ЯБ осуществляется в соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-Х) по рубрикам: K25.0-9 Язва желудка, K26.0-9 Язва двенадцатиперстной кишки; K27.0-9 Пептическая язва неуточненной локализации и дополнительно V98.0 *H. pylori* в качестве причины болезней, классифицированных в других рубриках [4]. Как видим, из приводимой классификации следует, что ЯБ может рассматриваться и как вариант идиопатического течения, где преобладает неинфекционный каузальный фактор, и как вариант, ассоциированный с инфицированием *H. pylori*. Считается, что *H. pylori*-независимые формы ЯБ встречаются с частотой ~10%, в то время как при *H. pylori*-ассоциированных формах ЯБ при локализации поражения в желудке этот патоген выявляются в 70%, а при поражении двенадцатиперстной кишки – в 90% случаев [5].

Основные пути инфицирования человека от больного хеликобактериозом: фекально-оральный, орально-оральный или ятрогенный (с инфицированными стоматологическими или эндоскопическими инструментами). Спектр патологического воздействия *H. pylori* на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта многообразен. Эти спиралевидные бактерии плотно прикрепляются к эпителиоцитам слизистой оболочки пилорического отдела желудка и двенадцатиперстной кишки и в процессе своей жизнедеятельности вырабатывают целый ряд ферментов, таких как уреазы, протеазы и фосфолипазы, каталаза и алкогольдегидрогеназа

(благодаря которым вокруг них образуются перекисные соединения и алкоголь, непосредственно повреждающие клетки слизистой оболочки), а также различные цитотоксины. Питание бактерии происходит за счет энергии расщепления трикарбоновых кислот и аминокислот пищевой массы. Под воздействием фермента уреазы *H. pylori* пристеночно в верхних отделах пищеварительного тракта большого происхождения происходит расщеплением мочевины с образованием аммиака, который взаимодействует с соляной кислотой желудочного сока, инактивируя ее и создавая благоприятные условия для жизнедеятельности бактерий.

Спиралевидные бактерии в тканях слизистой оболочки верхних отделов желудочно-кишечного тракта исследователи разных стран периодически выявляли у людей и животных в течение последних 150 лет, но трудности искусственного культивирования выявляемых бактерий не позволяли завершить их детальное изучение. Вопрос об этиологической роли *H. pylori* в развитии воспалительно-язвенных поражений слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки окончательно был решен в 1981–1983 гг. австралийскими исследователями Б.Маршаллом (Barry J. Marshall) и Дж.Уорреном (J. Robin Warren), которые за свои комплексные исследования были удостоены Нобелевской премии 2005 г. по медицине и физиологии [5].

В более поздних научных исследованиях была доказана причинно-следственная связь инфицирования людей *H. pylori* и последующего развития у них аденокарциномы и MALT-лимфомы желудка. Установлено также влияние хеликобактерий на развитие у людей железодефицитной анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, а также дефицита витамина B₁₂ [2, 3, 5, 6].

H. pylori является спиралевидной бактерией, не образующей спор, грамтрицательной, микроаэрофильной; на одном из полюсов имеется от 2 до 6 жгутиков, что обеспечивает ее активную подвижность в слизистой среде. При неблагоприятных внешних условиях возможна трансформация извитых форм бактерии в дормантные формы с обратимой утратой жгутиков [5–7].

Штаммы *H. pylori* неоднородны и отличаются по факторам патогенности и адаптации к жизни в кислой среде. Так, хеликобактерии I типа наиболее патогенны, так как имеют в своем геноме ген *cagA*, кодирующий экспрессию цитокин-ассоциированного белка (CagA), и ген *vacA*, отвечающий за образование вакуолизирующего цитотоксина (VacA). >40 генов вирулентности у хеликобактерий I типа сгруппированы в одном из сегментов хромосомы, который обозначается как «островок патогенности» (pathogenicity island/PAI). Штаммы I типа обладают более выраженной адгезией к эпителиоцитам и вызывают наиболее выраженное повреждающее действие на структуры слизистой оболочки макроорганизма. Штаммы хеликобактерий II типа не имеют гена *cagA*, что приводит к утере способности синтеза цитотоксинов CagA и VacA; эти штаммы не имеют PAI, они быстро поглощаются и перевариваются макрофагами. Таким образом, ген *cagA* является маркером штаммов с цитотоксическими свойствами и ассоциируется с развитием ЯБ, аденокарциномы и лимфомы [6, 7].

В процессе жизнедеятельности хеликобактер стимулирует адаптивный иммунитет макроорганизма, что приводит к

выработке защитных иммуноглобулинов разных классов. Эти факторы иммунитета не обеспечивают полного уничтожения *H. pylori*, и воспалительный процесс становится хроническим.

Клиническое течение ЯБ может сопровождаться тяжелыми осложнениями в виде кровотечений из поврежденных сосудов или даже прободения стенки желудка или двенадцатиперстной кишки с развитием перитонита. Появлению тяжелых осложнений способствуют такие факторы, как нарушение диеты, курение, физические нагрузки, прием ряда медикаментов (аспирин или нестероидные противовоспалительные препараты), тип колонизирующего макроорганизм штамма хеликобактера.

Для успешной терапии больного ЯБ необходимо своевременное проведение комплекса диагностических исследований. Действующими международными и национальными клиническими рекомендациями научных сообществ гастроэнтерологов регламентируется применение современных методов обследования больных для выявления *H. pylori*, выявления у бактерий молекулярно-генетических факторов патогенности и маркеров чувствительности к лекарственным средствам (антибиотикам), назначаемым с целью эрадикации патогена [8–10].

Среди диагностических технологий определения у больного *H. pylori* с неинвазивным получением образцов биоматериала следует относить:

- дыхательный тест с мочевиной, меченой ^{13}C (как для первичной диагностики, так и для контроля успешности проводимой терапии);
- исследование образца кала для определения антигена *H. pylori* в тесте бокового потока (иммунохроматографическом анализе);
- выявление антигенов *H. pylori* или маркеров его патогенности (генов *sagA* или *vacA*) в кале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Инвазивными являются методы диагностики *H. pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка, полученных при эзофагогастродуоденоскопии:

- быстрый уреазный тест с биоптатом,
- гистологическое исследование,
- выявление антигенов *H. pylori* или маркеров его патогенности (генов *sagA* или *vacA*) в ПЦР с биоптатом слизистой оболочки.

Инвазивными являются также и технологии иммунохимического определения в крови иммуноглобулинов разных классов к *H. pylori* (иммуноферментный, иммунохемилюминесцентный анализ и др.).

Разработаны условия и селективные плотные питательные среды для культивирования этого патогена и определения чувствительности выделенных штаммов к антимикробным препаратам, но они трудоемки, носят в большей мере исследовательский характер и в практическом здравоохранении не применяются.

Оптимальным по способу получения и времени выполнения неинвазивным методом обследования пациента является выявление антигена *H. pylori* в образцах кала, чему и посвящено это исследование.

Цель работы: оценка показателей диагностической информативности (клинической чувствительности и специфич-

ности, воспроизводимости, предсказательной ценности положительных и отрицательных результатов исследования) разработанного нами набора реагентов для одноэтапного качественного выявления *H. pylori* в образцах кала человека, основанном на технологии иммунохроматографического анализа [11].

Материалы и методы

Показатели диагностической информативности рассчитывали в соответствии с указаниями Национального стандарта РФ ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов» [12, 13].

Применялись наборы реагентов медицинского изделия «Тест-система иммунохроматографическая для качественного выявления *Helicobacter pylori* в образцах кала человека «ИХА-Хелико-антиген» производства АО «ЭКОлаб», РУ № РЗН 2019/9188 от 07.11.2019 (производственные серии 3/1236 от 2022 г., 1/2544 и 2/2736 от 2023 г.). Все исследования осуществляли в соответствии с прилагаемой к набору утвержденной инструкцией по его применению [11].

Основу указанного набора составляют реакционные пластиковые кассеты [11, 14–17], содержащие тестовые полоски, которые представляют собой уложенные в определенном порядке мембраны разной природы на твердой подложке из поливинилхлорида (рис. 1).

Подготовка проб для исследования

Для исследования получали свежие образцы кала обследуемых лиц, собранные в маркированные транспортные контейнеры или чашки Петри, не содержащие консерванты.

Аккуратно отвинчивали крышку одноразового пластикового флакона-капельницы с 2,0 мл буферного раствора для разведения пробы кала (входит в состав набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген»). Используя аппликатор, закрепленный изнутри на крышке флакона, из разных локаций транспортного контейнера или чашки Петри отбирали небольшое

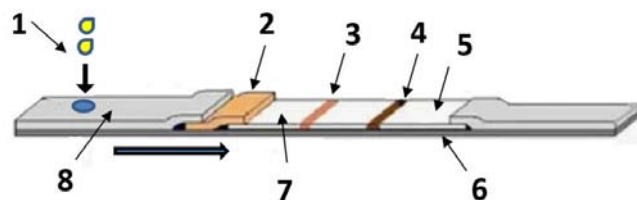


Рис. 1. Композиционная схема тест-полосок в составе набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген»: 1 – образец; 2 – мембрана с конъюгатами мышиных антител и антител к *H. pylori* с коллоидным золотом; 3 – тестовая линия с антителами к *H. pylori*; 4 – контрольная линия с анти-видовыми антителами; 5 – адсорбционная мембрана; 6 – твердая подложка из поливинилхлорида; 7 – иммуносорбент (нитроцеллюлозная мембрана); 8 – мембрана для образца.

Fig. 1. Compositional diagram of test strips in the IHA-Helicobacter antigen reagent kit: 1 – sample; 2 – membrane with conjugates of mouse antibodies and antibodies to *H. pylori* with colloidal gold; 3 – test line with antibodies to *H. pylori*; 4 – control line with anti-species antibodies; 5 – adsorption membrane; 6 – solid support made of polyvinyl chloride; 7 – immunosorbent (nitrocellulose membrane); 8 – membrane for sample.



Флакон-капельница для растворения образца / Dropper bottle for sample Dissolution

Исследуемый образец кала / The stool sample being tested

Внесение аппликатора с образцом кала во флакон-капельницу / Inserting the applicator with the stool sample into the dropper bottle

Рис. 2. Рекомендуемая схема сбора и разведения исследуемых проб кала.

Fig. 2. Recommended scheme for collecting and diluting stool samples for testing.

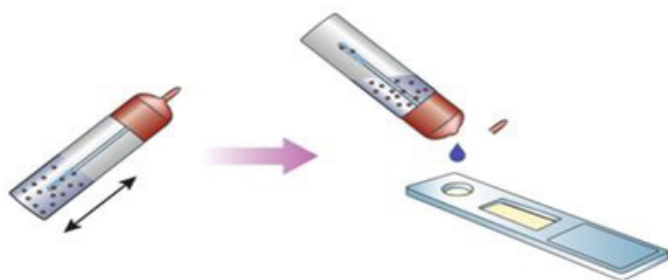


Рис. 3. Подготовка флакона-капельницы для внесения пробы на тест-кассету.

Fig. 3. Preparing a dropper bottle for adding a sample to the test cassette.

количество кала (200–250 мкг), переносили во флакон-капельницу. Крышку флакона завинчивали и несколько раз осторожно встряхивали для растворения пробы (рис. 2). Проба готова к исследованию. Для каждого образца кала использовали отдельный флакон-капельницу.

До исследования образцы кала хранили при температуре 2–8°C не более 2 суток; для более длительного хранения их замораживали при температуре -20°C и ниже. Перед исследованием образцы кала полностью размораживали и доводили до комнатной температуры; допускали только однократный цикл замораживания и оттаивания.

Порядок проведения исследования.

Все компоненты набора и подготовленные к исследованию образцы доводили до комнатной температуры (18–25°C).

Надев медицинские перчатки, извлекали тест-кассету из индивидуальной упаковки, не касаясь пальцами окна для внесения образца, маркировали ее кодовым номером пациента и размещали на ровной горизонтальной поверхности рабочего стола.

Встряхивали подготовленный флакон-капельницу с пробой, отламывали выступающий кончик на крышке и вносили по 3 капли суспензии исследуемого образца (100 мкл) в круглое отверстие тест-кассеты (рис. 3). Исследование проводили при комнатной температуре. Через 5–10 мин визуально оценивали результат исследования.

Принцип работы теста «ИХА-Хелико-антиген»

При наличии в исследуемой пробе антигенов *H. pylori* они связываются на мембране со специфичным конъюгатом (моноклональные антитела к антигенам *H. pylori*, меченные коллоидным золотом); в результате чего образуются иммунные комплексы «антиген исследуемой пробы + антитело конъюгата», которые мигрирует с током жидкости вдоль мембраны. В тестовой зоне мембраны (Т-зона) происходит взаимодействие этого иммунного комплекса с иммобилизованными на указанном участке моноклональными антителами к антигенам *H. pylori* с образованием более сложного комплекса «антитело подложки + антиген исследуемой пробы + антитело конъюгата». Накопление этих сложных иммунных комплексов в тестовой зоне формирует окрашенную розовую линию (положительный результат); интенсивность цвета линии пропорциональна количеству антигена *H. pylori*, содержащемуся в исследуемой пробе.

При отсутствии в исследуемой пробе искомого анализата не происходит образование сложных иммунных комплексов и их накопление в Т-зоне мембраны; окрашенная линия не формируется – отрицательный результат.

При любом сценарии не вступившие в реакцию в Т-зоне конъюгаты, продвигаясь вдоль мембраны, взаимодействуют с антителами, иммобилизованными в области контрольной зоны (С), с образованием окрашенного иммунного комплекса. Цветная контрольная С-линия должна формироваться всегда, независимо от наличия антигенов *H. pylori* в образце, что является внутренним контролем валидации рабочей мембраны и соблюдения условий проведения исследования. Отсутствие окрашенной контрольной полосы по завершении теста (через 10 мин наблюдения) свидетельствует о нарушении свойств использованной мембраны, результат определения считается недействительным, необходимо повторное исследование пробы с валидной кассетой (рис. 4).

Отрицательный результат исследования указывает на отсутствие антигенов *H. pylori* в исследуемой пробе или их наличие в концентрации ниже порога детекции. Положительный результат анализа указывает на выявление *H. pylori* в исследуемой пробе.

Избыточное количество образца кала во флаконе-капельнице может приводить к появлению некорректных результатов (появлению нечетких линий темного цвета); необходимо повторно приготовить разведение образца кала с меньшим количеством твердого образца и повторить исследование с новой тест-кассетой «ИХА-Хелико-антиген».

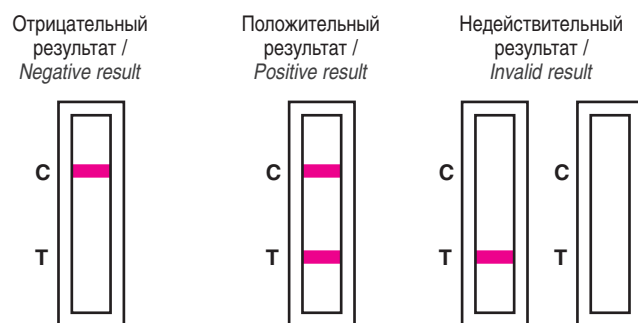


Рис. 4. Критерии интерпретации полученного результата в иммунохроматографическом исследовании.

Fig. 4. Criteria for interpreting the results obtained in an immunochromatographic study.

Таблица 1. Результаты исследований с «ИХА-Хелико-антиген» образцов кала, предварительно характеризованных по содержанию возможных интерферирующих факторов
Table 1. Results of studies with the “IHA-Helico-antigen” of stool samples, previously characterized by the content of possible interfering factors

Образцы кала / Stool samples	Кол-во / Quantity	Результаты исследований с «ИХА-Хелико-антиген» / Results of studies with «IHA-Helico-antigen»					
		серия 3/1236 от 2022 г. / series 3/1236 from 2022		серия 1/2544 от 2023 г. / series 1/2544 from 2023		серия 2/2736 от 2023 г. / series 2/2736 from 2023	
		+	-	+	-	+	-
с <i>H. pylori</i> и повышенным содержанием билирубина / with <i>H. pylori</i> and elevated bilirubin levels	42	42 (100%)	0 (0%)	42 (100%)	0 (0%)	42 (100%)	0 (0%)
с <i>H. pylori</i> и повышенным содержанием аскорбиновой кислоты / with <i>H. pylori</i> and high levels of ascorbic acid	38	38 (100%)	0 (0%)	38 (100%)	0 (0%)	38 (100%)	0 (0%)
с <i>H. pylori</i> и повышенным содержанием триглицеридов / with <i>H. pylori</i> and elevated triglycerides	39	39 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)
без <i>H. pylori</i> , с повышенным содержанием билирубина / without <i>H. pylori</i> , with elevated bilirubin	35	0 (0%)	35 (100%)	0 (0%)	35 (100%)	0 (0%)	35 (100%)
без <i>H. pylori</i> , с повышенным содержанием аскорбиновой кислоты / without <i>H. pylori</i> , with increased ascorbic acid content	34	0 (0%)	34 (100%)	0 (0%)	34 (100%)	0 (0%)	34 (100%)
без <i>H. pylori</i> , с повышенным содержанием триглицеридов / without <i>H. pylori</i> , with elevated triglyceride levels	32	0 (0%)	32 (100%)	0 (0%)	32 (100%)	0 (0%)	32 (100%)

+ – положительный результат, – – отрицательный результат.

В качестве контрольного материала для оценки параметров качества разработанного теста применяли стандартные образцы предприятия (СОП-275), содержащие и не содержащие рекомбинантные белки, являющиеся полными аналогами антигенов *H. pylori*.

В качестве референс-системы был использован «Тест иммунохроматографический «РЭД *Helicobacter pylori*» для *in vitro* одноэтапного быстрого качественного выявления *Helicobacter pylori* в кале» (выпуска ООО «РЭД», Москва, по РУ № ФСР 2012/13624 от 29.06.2012); серии 180805-01 и 210376-01.

При изучении показателей диагностической информативности разработанного набора реагентов были проанализированы результаты исследований с образцами кала, содержащими ($n = 274$) и не содержащими ($n = 261$) *H. pylori*, полученными от больных и проходивших диспансерное обследование здоровых лиц из:

- МУЗ «Павлово-Посадская ЦРБ» (лицензия на осуществление медицинской деятельности №ЛО-50-01-004916 от 18.12.2013);
- ГБУЗ МО «Электрогорская городская больница» (лицензия №ЛО-50-01-006444 от 19.02.2015);
- диагностического центра «El Clinic» АО «ЭКОлаб» (лицензия №ЛО-50-01-006551 от 08.04.2015).

Пациенты указанных клинических учреждений имели разные диагнозы в соответствии с МКБ-Х из разделов K25–K30 [4]; все они подписывали информированное согласие на проведение клинических лабораторных исследований.

С целью изучения факторов потенциальной интерференции на результаты иммунохроматографических исследований и выявления возможных перекрестных реакций из общего числа предоставленных для исследования образцов кала дополнительно были выделены пробы (как содержавшие, так и не содержавшие *H. pylori*) с учетом следующих показателей: повышенное содержание билирубина (соответственно $n = 24$ и $n = 35$), аскорбиновой кислоты (соответ-

ственно $n = 25$ и $n = 32$) или триглицеридов (соответственно $n = 26$ и $n = 32$).

Результаты исследования и их обсуждение

1. На начальном этапе работы была проведена оценка рабочих свойств трех последовательных серий набора «ИХА-Хелико-антиген» (по ТУ 21.20.23-275-70423725-2019) с контрольными материалами СОП-275 (образцы №1 и №2 – не содержавшие *H. pylori*, образцы №3 и №4 – содержавшие *H. pylori*) в трех повторах с каждым образцом.

Результаты испытаний установили развитие окраски на тест-полосках через 6–7,5 мин наблюдения в зоне контроля для образцов №1 и №2 СОП-275 и в тест-зонах и зонах контроля для образцов №3 и №4 СОП-275, что позволило оценить полное соответствие реакционных кассет рабочих серий набора «ИХА-Хелико-антиген» нормативной документации по показателям чувствительности, специфичности, воспроизводимости и времени достижения устойчивых результатов.

2. Продолжением исследования явилась оценка влияния на результаты определения с набором «ИХА-Хелико-антиген» возможных интерферирующих факторов, таких как повышенное содержание билирубина, аскорбиновой кислоты или триглицеридов в образцах кала с *H. pylori* (соответственно $n = 42$, 38 и 39) или без *H. pylori* (соответственно $n = 35$, 34 и 32) (табл. 1).

Таким образом, результатами испытаний показано отсутствие интерференции изученных факторов на результаты определения антигенов *H. pylori* в образцах кала и, как следствие, получения ложных положительных или ложноотрицательных результатов исследования.

3. Изучение показателей диагностической информативности в соответствии с указаниями Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 53022.3-2008 [12] было проведено с использованием 535 образцов кала, содержавших и не содержавших *H. pylori*.

Таблица 2. Результаты исследований с «ИХА-Хелико-антиген» и набором реагентов сравнения
 Table 2. Results of studies with "IHA-Helico-antigen" and a set of comparison reagents

Образцы кала / Stool samples	n	Результаты исследования с «ИХА-Хелико-антиген» / Results of studies with «IHA-Helico-antigen»						Результаты исследования с «РЭД <i>H. pylori</i> » / Results of the study with «RED <i>H. pylori</i> »	
		серия 3/1236 от 2022 г. / series 3/1236 from 2022		серия 1/2544 от 2023 г. / series 1/2544 from 2023		серия 1/2544 от 2023 г. / series 1/2544 from 2023		+	-
		+	-	+	-	+	-		
Содержавшие <i>H. pylori</i> / containing <i>H. pylori</i>	274	274 (100%)	0 (0%)	272 (99,27%)	2 (0,73%)	273 (99,64%)	1 (0,036%)	124 (100%)	0 (0%)
Не содержавшие <i>H. pylori</i> / did not contain <i>H. pylori</i>	261	3 (1,15%)	258 (98,85%)	1 (0,38%)	260 (99,62%)	0 (0%)	261 (100%)	0 (0%)	261 (100%)

+ – положительный результат, – – отрицательный результат.

Образцы кала, содержавшие *H. pylori* ($n = 274$), были получены от больных, проходивших обследование и лечение по поводу гастрита или ЯБ в лечебно-профилактических учреждениях Московской области с разными диагнозами по МКБ-Х (2003 г.): К25.3 – язва желудка острая без кровотечения и прободения ($n = 23$), К25.7 – язва желудка хроническая без кровотечения и прободения ($n = 21$), К26.7 – язва двенадцатиперстной кишки острая без кровотечения и прободения ($n = 54$), К27.7 – язва хроническая пептическая неуточненной локализации без кровотечения или прободения ($n = 21$), К29.1 – другие острые гастриты ($n = 16$); К29.3 – хронический поверхностный гастрит ($n = 96$), К29.4 – хронический атрофический гастрит ($n = 27$), К30 – функциональная диспепсия ($n = 16$).

По результатам лабораторного обследования образцов кала с наборами реагентов сравнения «РЭД *Helicobacter pylori*» все пациенты дополнительно были отнесены к рубрике: В98.0 – *H. pylori* в качестве причины болезней, классифицированных в других рубриках. Распределение обследованных пациентов по полу и возрасту: 155 мужчин и 119 женщин в возрасте от 18 до 65 лет.

Образцы кала, не содержавшие *H. pylori* ($n = 261$), были получены от лиц, не предъявлявших жалобы на заболевание желудка или двенадцатиперстной кишки, проходивших плановое диспансерное обследование. В этой группе были представлены 159 женщин и 102 мужчины в возрасте от 25 до 62 лет.

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 2; при этом были применены следующие критерии оценки [12]:

- истинно положительные результаты – положительные результаты, полученные в группе больных;
- ложноотрицательные результаты – отрицательные результаты, полученные при обследовании больных лиц;
- ложноположительные результаты – положительные результаты, полученные при обследовании лиц без заболевания (у «здоровых лиц»);
- истинно отрицательные результаты – отрицательные результаты, полученные при обследовании лиц без заболевания.

На основании изучения и анализа полученных данных были рассчитаны показатели диагностической информативности результатов обследования с использованием набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген», разработанного АО «ЭКОлаб» [12, 13, 18]:

1) априорная вероятность болезни = $(a + c) / (a + b + c + d)$ – доля больных в обследуемой группе; показатель составил 51,21%;

2) клиническая чувствительность = $a / (a + c)$ – доля истинно положительных результатов в группе больных; для каждой серии набора соответственно 100; 99,27 и 99,64%; средний показатель – 99,64%;

3) клиническая специфичность = $d / (b + d)$ – доля истинно отрицательных результатов в группе здоровых лиц; соответственно 99,85; 99,62 и 100%; средний показатель – 99,49%;

4) предсказательная ценность положительного результата = $a / (a + b)$ – доля истинно положительных результатов среди всех положительных результатов; соответственно 98,92; 99,63 и 100%; средний показатель – 99,52%;

5) предсказательная ценность отрицательного результата = $d / (c + d)$ – доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных результатов; соответственно 100; 99,29 и 99,62%; средний показатель – 99,62%;

6) диагностическая эффективность теста, или индекс точности = $(a + d) / (a + b + c + d)$ – доля истинных результатов среди всех результатов теста; соответственно 99,44; 99,44 и 99,81%; средний показатель – 99,56%;

7) отношение правдоподобия положительного результата теста = $a / (a + c) / b / (b + d)$ [12] или = чувствительность / $(1 - \text{специфичность})$ [13, 18] – вероятность обнаружения признака у больного по отношению к вероятности такого же обнаружения у пациента без заболевания или показатель, во сколько раз вероятность получения положительного результата у больного выше, чем у здорового лица; средний показатель – 195,37;

8) отношение правдоподобия отрицательного результата теста = $c / (a + c) / d / (b + d)$ или = $(1 - \text{чувствительность} / \text{специфичность})$ [13, 18] – вероятность обнаружения признака у пациента без заболевания по отношению к вероятности такого же обнаружения у больного или показатель, во сколько раз вероятность получения отрицательного у больного ниже, чем у здорового лица; средний показатель – 0,0036.

Таким образом, в результате проведенных клинических лабораторных испытаний была показана высокая клиническая чувствительность (99,64%) и клиническая специфичность (99,49%) результатов лабораторных иммунохроматографических исследований, высокие уровни предсказательной ценности положительных и отрицательных результатов (соответственно 99,52 и 99,62%), что характеризует общую диагностическую эффективность теста на уровне 99,56%. Показатели правдоподобия полученных положительных (195,37) и отрицательных результатов (0,0036) позволяют с высокой долей уверенности применять получаемые при ис-

пользовании набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген» данные для установления или подтверждения клинических диагнозов у обследуемых лиц, а также в процессе проведения этиотропной терапии.

Заключение

На предприятии АО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск) был разработан и зарегистрирован в Российской Федерации набор реагентов «ИХА-Хелико-антиген» для одноэтапного быстрого качественного выявления антигенов *H. pylori* в образцах кала человека методом иммунохроматографического анализа с целью первичной диагностики инфекции *H. pylori* (ПУ № РЗН 2019/9188 от 07.11.2019) и с 2020 г. организован его серийный производственный выпуск.

Изучение трех производственных серий набора позволило установить его полное соответствие нормативной документации (ТУ 21.20.23-275-70423725-2019) по показателям чувствительности, специфичности, воспроизводимости результатов исследования и времени достижения устойчивых результатов. Не выявлено ложноположительных или ложноотрицательных результатов в иммунохроматографических исследованиях с повышенным содержанием возможных интерферирующих факторов (билирубина, аскорбиновой кислоты или триглицеридов).

Анализ результатов клинического изучения 535 образцов кала, в т.ч. содержащих ($n = 274$) и не содержащих ($n = 261$) *H. pylori*, с реагентами набора «ИХА-Хелико-антиген» позволил рассчитать показатели диагностической информативности теста: высокие по клинической чувствительности (99,64%), клинической специфичности (99,49%) и воспроизводимости результатов, общей диагностической эффективности (99,56%), предсказательной ценности положительных (99,52%) и отрицательных (99,62%) результатов. Показатели правдоподобия полученных положительных (195,37) и отрицательных (0,0036) результатов позволяют с высокой долей уверенности рекомендовать применение набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген» в лечебно-диагностических учреждениях здравоохранения для установления клинических диагнозов при оказании медицинской помощи населению.

Информация о финансировании

Исследование выполнено при спонсорской поддержке АО «ЭКОлаб».

Financial support

The study was carried out with the sponsorship of JSC "EKOlab".

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare the absence of conflict of interests.

Литература

1. Язвенная болезнь и ее профилактика [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://34.rosпотребнадзор.ru/content/281/14093/> (дата обращения: 28.02.2024).
2. Руссиянов ВВ, Афанасенкова ТЕ, Никитин ГА, Ильющенов ПА. Обсемененность слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* при язвенной болезни и хроническом гастрите в разные сезоны года. Журнал экспериментальной, клинической и профилактической медицины (Врач-аспирант). 2013;56(1.2):281-285.
3. Пахомова АЛ. Антисекреторная терапия язвенной болезни. Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2012;2(5):269-293.
4. МКБ-10 – Бактериальные, вирусные и другие инфекционные агенты (B95-B98). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://mkb-10.com/index.php?pid=918> (дата обращения: 28.02.2024).
5. Бордин ДС, Шенгелия МИ, Иванова ВА, Войнован ИН. История открытия бактерии *Helicobacter pylori*. Терапевтический архив. 2022;94(2):283-288. DOI: 10.26442/00403660.2022.02.201377
6. Исаева ГШ, Валиева РИ. Биологические свойства и вирулентность *Helicobacter pylori*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018;20(1):14-23. DOI: 10.36488/смас.2018.1.14-23
7. Голубкина ЕВ, Камнева ЕВ, Умерова АР. Роль *cagA* гена в диагностике ассоциированных с *Helicobacter pylori* заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. Астраханский медицинский журнал. 2017;12(2):8-14.
8. Ивашкин ВТ, Маев ИВ, Лапина ТЛ, Шептулин АА, Трухманов АС, Баранская ЕК, и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2018;28(1):55-70. DOI: 10.22416/1382-4376-2018-28-1-55-70
9. Лазебник ЛБ, Бордин ДС, Дехнич НН, и др. VII Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori* (VII Московские соглашения): Методические рекомендации. Рос. научн. мед. об-во терапевтов; Научн. об-во гастроэнтерол. России. 2021.
10. Пиманов СИ, Макаренко ЕВ. Обновленные рекомендации: Маастрихт VI. Флорентийского консенсуса по лечению инфекции *Helicobacter pylori*. Consilium Medicum. 2022;24(12):851-859. DOI: 10.26442/20751753.2022.12.20 2045
11. Акиншина ЮА, Марданлы СГ, Ротанов СВ, Ханина МА. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2024;69(4):123-130. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130
12. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов» (утв. Приказом Росстандарт №557-ст от 18.12.2008).
13. Гринхальх Т. Гл. 7: Статьи, посвященные исследованиям диагностических и скрининговых тестов. В кн.: Основы доказательной медицины (пер. с англ. под ред. Денисова ИН и Сайткулова КИ. 3-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009). Мед. образование и профессиональное развитие. 2012;7(1):67-77.
14. Акиншина ЮА, Марданлы СГ, Ротанов СВ, Помазанов ВВ, Киселева ВА. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. Клиническая лабораторная диагностика. 2022;67(2):91-96. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-2-91-96
15. Серякова ПВ, Марданлы СГ. Разработка иммунохроматографической тест-системы для качественного определения миоглобина. Известия ГГТУ. Медицина, фармация. 2022;13(1):53-54. DOI: 10.51620/2687-1521-2022-1-13-53-54
16. Акиншина ЮА, Марданлы СГ. Иммунохроматографический тест для количественного определения простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке, плазме или цельной крови человека «ИХА-ПСА». Известия ГГТУ. Медицина, фармация. 2023;14(2):9-14. DOI: 10.51620/2687-1521-2023-2-14-9-14
17. Акиншина ЮА, Марданлы СГ, Ротанов СВ, Мальшев ВВ, Змеева ТА, Гумилевский БЮ, и др. Разработка иммунохроматографического набора

реагентов для выявления ротавирусов. Клиническая лабораторная диагностика. 2023;68(11):672-679. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-11-672-679

18. McGee S. Simplifying likelihood ratios. J Gen Intern Med. 2002 Aug;17(8):646-9. DOI: 10.1046/j.1525-1497.2002.10750.x

References

1. Peptic ulcer and its prevention [Electronic resource]. Website of the Rosпотребнадзор Office at 04.09.2023. Available at: <https://34.rospotrebnadzor.ru/content/281/14093/> (accessed 28.02.2024). (In Russian).
2. Russiyanov VV, Afanasenkova TE, Nikitin GA, Il'yushchenov PA. Dissemination of a mucous membrane of stomach *Helicobacter pylori* at peptic ulcer and chronic gastritis during different seasons of year. Postgraduate Doctor. 2013;56(1.2):281-285.
3. Pakhomova AL. Antisecretory therapy for peptic ulcer. Bulletin of Medical Internet Conferences. 2012;2(5):269-293. (In Russian).
4. International Classification of Diseases, 10th revision (ICD-10). [Electronic resource]. Available at: <https://mkb-10.com/index.php?pid=918> (accessed 28.02.2024). (In Russian).
5. Bordin DS, Shengelia MI, Ivanova VA, Voynovan IN. The history of the discovery of the *Helicobacter pylori*. Terapevicheskii arkhiv. 2022;94(2):283-288. DOI: 10.26442/00403660.2022.02.201377 (In Russian).
6. Isaeva GSh, Valieva RI. Biological properties and virulence *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2018;20(1):14-23. DOI: 10.36488/cmac.2018.1.14-23 (In Russian).
7. Golubkina EV, Kamneva NV, Umerova AR. Role of the *cagA* gene in diagnostics of *Helicobacter pylori* associated diseases of stomach and duodenum. Astrakhan Medical Journal. 2017;12(2):8-14. (In Russian).
8. Ivashkin VT, Mayev IV, Lapina TL, Sheptulin AA, Trukhmanov AS, Baranskaya YeK, et al. Diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults: clinical guidelines of the Russian gastroenterological association. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2018;28(1):55-70. DOI: 10.22416/1382-4376-2018-28-1-55-70 (In Russian).
9. Lazebnik LB, Bordin DS, Dekhnich NN, et al. VII National recommendations for the diagnosis and treatment of diseases associated with *Helicobacter pylori* (VII Moscow Agreements): Methodological recommendations. Rossiiskoe nauchnoe meditsinskoe obshchestvo terapevtov, Nauchnoe obshchestvo gastroenterologov Rossii. 2021. (In Russian).
10. Пиманов СИ, Макаренко ЕВ. Обновленные рекомендации: Маастрихт VI. Флорентийского консенсуса по лечению инфекции *Helicobacter pylori*. Consilium Medicum. 2022;24(12):851-859. DOI: 10.26442/20751753.2022.12.20 2045 (In Russian).
11. Akinshina YuA, Mardarly SG, Rotanov SV, Khanina MA. On immunochromatographic detection of *Helicobacter pylori*. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2024;69(4):123-130. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130 (In Russian).

12. National standard of the Russian Federation GOST R 53022.3-2008 "Clinical laboratory technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research. Part 3. Rules for assessing the clinical informativeness of laboratory tests" (approved by Order of Rosstandart No 557st, dated December 18, 2008). (In Russian).
13. Greenhalgh T. Glava 7: Stati posviashchennye issledovaniyam diagnosticheskikh i skringovykh testov. In In the book: Fundamentals of evidence-based medicine (transl. from English, ed. by Denisov IN and Saitkulov KI. 3rd ed. M.: GEOTAR-Media Publ., 2009). Med obrazovanie i professionalnoe razvitie. 2012;7(1):67-77. (In Russian).
14. Akinshina YuA, Mardarly SG, Rotanov SV, Pomazanov VV, Kiseleva VA. About quantitative determination of the D-dimer in the blood by immunochromatographic method. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2022;67(2):91-96. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-2-91-96 (In Russian).
15. Seriakova PV, Mardarly SG. Development of an immunochromatographic test system for the qualitative determination of myoglobin. Izvestiia GGTU. Meditsina, Farmatsiia. 2022;13(1):53-54. DOI: 10.51620/2687-1521-2022-1-13-53-54 (In Russian).
16. Akinshina YuA, Mardarly SG. Immunochromatographic test for semi-quantitative determination of prostate-specific antigen (PSA) in human serum, plasma or whole blood "IHA-PSA". Izvestiia GGTU. Meditsina, Farmatsiia. 2023;14(2):9-14. DOI: 10.51620/2687-1521-2023-2-14-9-14 (In Russian).
17. Akinshina YuA, Mardarly SG, Rotanov SV, Malyshev VV, Zmeeva TA, Gumilevsky BYu, et al. Development of a immunochromatographic test kit for the detection of rotaviruses. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2023;68(11):672-679. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-11-672-679 (In Russian).
18. McGee S. Simplifying likelihood ratios. J Gen Intern Med. 2002 Aug;17(8):646-9. DOI: 10.1046/j.1525-1497.2002.10750.x

Информация о соавторах:

Марданлы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, профессор, президент и директор по науке АО «ЭКОлаб», профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет»

Акиншина Юлия Александровна, руководитель научно-производственного отдела иммунохроматографических тест-систем АО «ЭКОлаб»

Ханина Миниса Абдуллаевна, доктор фармацевтических наук, заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии ГОУ ВО Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет»

Information about co-authors:

Seyfaddin G. Mardarly, MD, PhD, DSc, Professor, President and Director of Science of JSC "ECOLab", Professor of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines, State Humanitarian and Technological University

Yulia A. Akinshina, Head of the Scientific and Production Department of Immunochromatographic Test Systems of JSC "ECOLab"

Minisa A. Khanina, DSc in Pharmaceutical Sciences Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, State Humanitarian and Technological University

Оптимизация метода селекции при конструировании мутантных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*

А.С.Трунякова, Р.З.Шайхутдинова, С.В.Дентовская

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

Аллельный обмен часто используется у бактерий для создания нокаутных мутантов в интересующих генах для проведения фенотипического анализа и изучения их функций. Часто понимание функции генов микроорганизмов в сложных процессах, таких как патогенез вызываемых инфекций, требует создания множества мутантных штаммов. Для оптимизации метода селекции клеток псевдотуберкулезного микроба на этапе первичной рекомбинации изучили возможность использования препаратов с антибактериальной активностью – триклозана, полимиксина Б и генцианвиолета. Определили минимальные ингибирующие концентрации исследуемых селективных препаратов, а также оптимальные концентрации для селекции, выявили штаммовые отличия в чувствительности к полимиксину Б и генцианвиолету. При первичной рекомбинации триклозан, полимиксин Б и генцианвиолет полностью подавляли рост донорного штамма *Escherichia coli* S17(λ pir), тем самым позволяя эффективно провести отбор мутантного штамма *Yersinia pseudotuberculosis* 85 Δ surA pCad⁺.

Ключевые слова: селективный агент, конъюгативный перенос, *Yersinia*

Для цитирования: Трунякова А.С., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В. Оптимизация метода селекции при конструировании мутантных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Бактериология. 2024; 9(3): 64–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-64-66

Optimization of selection method in the construction of mutant strains of *Yersinia pseudotuberculosis*

A.S.Trunyakova, R.Z.Shaikhutdinova, S.V.Dentovskaya

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

Allelic exchange is often used in bacteria to create knockout mutants in genes of interest for phenotypic analysis and study of their function. Often, understanding the function of microbial genes in complex processes, such as the pathogenesis of infections, requires the creation of many mutant strains. To optimize the method of selection of *Yersinia pseudotuberculosis* at the stage of primary recombination, was studied the possibility of using drugs with antibacterial activity – triclosan, polymyxin B and gentian violet. The minimum inhibitory concentrations of the studied selective drugs was determined, as well as the optimal concentrations for selection. Strain differences in sensitivity to polymyxin B and gentian violet were identified. During primary recombination, triclosan, polymyxin B, and gentian violet completely suppressed the growth of the donor strain *Escherichia coli* S17(λ pir), thereby allowing effective selection of the mutant strain *Y. pseudotuberculosis* 85 Δ surA pCad⁺.

Key words: Selective agent, conjugative transfer, *Yersinia*

For citation: Trunyakova A.S., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V. Optimization of selection method in the construction of mutant strains of *Yersinia pseudotuberculosis*. Bacteriology. 2024; 9(4): 64–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-64-66

Одним из самых распространенных способов создания нокаутных мутантов грамотрицательных бактерий является сайт-направленный мутагенез с использованием для аллельного обмена суицидных векторов, например несущих точку начала репликации R6K, которые способны репли-

цироваться только в штаммах, продуцирующих ϕ -белок из λ -фага [1]. Суицидные векторы можно использовать для осуществления аллельного обмена гена дикого типа на мутантную аллель, кодируемую плазмидой. Аллельный обмен является двухэтапной процедурой с интеграцией плазмиды в

Для корреспонденции:

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы 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) 36-0102

Статья поступила 29.03.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Alexandra S. Trunyakova, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0102

The article was received 29.03.2024, accepted for publication 25.12.2024

целевой ген путем рекомбинации с последующим ее удалением посредством второго кроссинговера. Реципиентные бактериальные клетки отбирают с помощью маркерного антибиотика, используемого для инактивации целевого гена (первое событие рекомбинации), при этом для удаления донорного штамма можно использовать второй селективный агент. Элиминацию интегрированной плазмиды, которая приводит к аллельному обмену (второе событие рекомбинации), ведут с использованием маркеров для контрселекции [2, 3] и подтверждают утратой устойчивости к антибиотику, ген которого кодируется суицидным вектором [1].

Одним из способов получения делеционных мутантов *Yersinia pseudotuberculosis* является конъюгативный перенос суицидных векторов, содержащих модифицированные гены [2]. Для селекции реципиентных штаммов чумного микроба при создании нокаутных мутантов с использованием суицидного вектора pCVD442, вводимого методом конъюгативного переноса из донорного штамма *Escherichia coli* S17, успешно используют полимиксин Б [4]. В случае сайт-направленного мутагенеза псевдотуберкулезного микроба спектр селективных агентов, позволяющих эффективно отобрать реципиентный штамм от донора после конъюгации, недостаточно изучен.

Целью настоящего исследования является оптимизация метода селекции клеток псевдотуберкулезного микроба на этапе первичной рекомбинации с использованием препаратов с антибактериальной активностью – триклозана, полимиксина Б и генцианвиолета.

Материалы и методы

В исследовании использовали штаммы псевдотуберкулезного микроба серотипов O:3 (*Y. pseudotuberculosis* 85pCad⁺ и *Y. pseudotuberculosis* H-4795), O:1b (*Y. pseudotuberculosis* 529-3260 pVM82⁺pCad⁺) и *E. coli* S17λpir/pCVD442 в качестве контрольного штамма.

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) возможных селективных агентов полимиксин Б, триклозан и генцианвиолет последовательно разводили в бульоне LB начиная с концентрации 2000, 16667 и 50 мкг/мл соответственно. В качестве контроля брали среду LB без добавления селективных агентов. В среду добавляли 10⁷ КОЕ исследуемых штаммов и инкубировали в течение суток при температуре 28°C. Выживание оценивали путем фотометрии при 620 нм с использованием анализатора Multiskan Labsystems (Финляндия).

Конъюгативный перенос и отбор первичных рекомбинантов осуществляли как описано ранее [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Выбранные для тестирования препараты относятся к разным классам: триклозан – полихлорфеноксибензол, полимиксин Б – полипептидный антибиотик, а генцианвиолет – основной краситель трифенилметанового ряда.

Известно, что триклозан при высоких концентрациях (0,2–2%) обладает бактерицидным действием, повреждая цитоплазму и мембрану бактериальных клеток, при невысоких концентрациях (0,001–0,01%) проявляет бактериостатические свойства, подавляя синтез жирных кислот, что позволяет использовать препарат в селективных средах [5]. Действие полимиксина Б преимущественно основано на способности связываться с фосфатными группами липида А молекул липополисахаридов бактерий, что приводит к нарушению барьерных функций клеточной стенки и к гибели клеток [6]. В штаммах *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, в отличие от штаммов *E. coli*, фосфатные группы защищены 4-амино-4-дезоксид-L-арабинозой (Ara4N) уменьшающей вероятность связывания полимиксина Б [7]. Поэтому полимиксин Б традиционно используется при селективном отборе. Генцианвиолет обладает высокой бактериостатической активностью в отношении грамположительных бактерий (1:500000 – 1:650000); против грамотрицательных бактерий действует только в концентрациях от 1:1000 (*E. coli*, *Salmonella Typhi*) до 1:40000 (*Shigella dysenteriae*). Такая дифференциальная чувствительность различных бактерий к генцианвиолету позволяет использовать его при изготовлении селективных сред [8, 9].

Для изучения чувствительности штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* к действию антибактериальных агентов определили МИК полимиксина Б, триклозана и генцианвиолета методом серийных разведений в жидкой питательной среде (таблица).

Донорный штамм кишечной палочки проявлял повышенную чувствительность к триклозану, полимиксину Б и генцианвиолету, подавляющим рост в концентрациях 8, 1,95 и 4,75 мкг/мл соответственно. Обнаружили штаммовые отличия в чувствительности: штамм *Y. pseudotuberculosis* 85pCad⁺ был в 4 раза более чувствителен к полимиксину Б, чем *Y. pseudotuberculosis* 529-3260 pVM82⁺pCad⁺ и *Y. pseudotuberculosis* H-4795 и в 2 раза устойчивее к генцианвиолету. Отличий в устойчивости штаммов *Y. pseudotuberculosis* к триклозану не было обнаружено. Устойчивость штаммов псевдотуберкулезного микроба превышала устойчивость кишечной палочки в 2, 250–1000 и 3–8 раз к триклозану, полимиксину Б и генцианвиолету, соответственно.

Оптимальной концентрацией полимиксина Б для селекции мутантных штаммов на основе *Y. pseudotuberculosis*

Таблица. Минимальная ингибирующая концентрация триклозана, полимиксина Б и генцианвиолета в плотной питательной среде
Table. Minimum inhibitory concentration of triclosan, polymyxin B and gentian violet in solid nutrient medium

Штамм / Strain	МИК, мкг/мл / MIC mcg/ml		
	Триклозан (иргазан) / Triclosan (irgasan)	Полимиксин Б / Polymyxin B	Генцианвиолет / Gentian violet
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 85pCad ⁺	16	250	25
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 529-3260 pVM82 ⁺ pCad ⁺	16	1000	12,5
<i>Y. pseudotuberculosis</i> H-4795	16	1000	12,5
<i>E. coli</i> S17λpir/pCVD442	8	1,95	4,75

85pCad⁺ является диапазон 2–250 мкг/мл; для генцианвиолета – 5–25 мкг/мл, триклозана – 10–15 мкг/мл. Для штаммов *Y. pseudotuberculosis*H-4795 и *Y. pseudotuberculosis* 529-3260 pVM82⁺pCad⁺ оптимальная концентрация полимиксина Б находится в диапазоне 2–1000 мкг/мл, генцианвиолета – 5–12,5 мкг/мл.

Эффективность выбранных селективных агентов изучили на этапе первичной рекомбинации штамма *Y. pseudotuberculosis* 85pCad⁺ с мутацией в гене *surA*. Донорный штамм *E. coli* S17(λpir) элиминировали добавлением в среду культивирования триклозана (10 мкг/мл), полимиксина Б (50 мкг/мл), генцианвиолета (10 мкг/мл). Селективные агенты полностью подавляли рост донорного штамма. Эффективность роста мутантного штамма *Y. pseudotuberculosis* 85Δ*surA* pCad⁺, содержащего суицидный вектор pCVD442, на среде с добавлением триклозана составила $3,5 \cdot 10^2$ КОЕ/мл, полимиксина Б – $3,9 \cdot 10^2$ КОЕ/мл, генцианвиолета – $2,6 \cdot 10^2$ КОЕ/мл.

Заключение

Таким образом, исследуемые антибактериальные препараты могут быть использованы для подавления роста донорных штаммов кишечной палочки при конъюгации, а также могут быть взаимозаменяемы при обнаружении отсутствия устойчивости у разных псевдотуберкулезных штаммов.

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

1. Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J Bacteriol. 1988 Jun;170(6):2575-83. DOI: 10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988
2. Donnenberg MS, Kaper JB. Construction of *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using of positive-selection suicide vector. Infect Immun. 1991;59:4310-4317. DOI: 10.1128/iai.59.12.4310-4317.1991
3. Selbitschka W, Niemann S, Puhler A. Construction of gene replacement vectors for Gram (-) bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;38:615-618.
4. Дентовская СВ, Иванов СА, Копылов ПХ, Шайхутдинова РЗ, Платонов МЕ, Комбаровая ТИ, и др. Избирательная протективность Δ*nlpD*-мутантов *Yersinia pestis*. Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2015;1(24):108-115.
5. Fukushima H, Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin

- agar. J Clin Microbiol. 1986 Jul;24(1):116-20. DOI: 10.1128/jcm.24.1.116-120.1986
6. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat. 2010;13(4-5):132-8. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002
7. Титарева ГМ, Фурсова НК, Балахонов СВ. Штаммовые отличия *Yersinia pestis* по чувствительности к бактерицидному действию полимиксина В. Успехи современного естествознания. 2003;10:100.
8. Лебедева МН. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. Учебное пособие. Медгиз, 1973.
9. Руководство по профилактике чумы. Под ред. Наумова АВ, Самойловой ЛВ. Саратов, 1992.

References

1. Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J Bacteriol. 1988 Jun;170(6):2575-83. DOI: 10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988
2. Donnenberg MS, Kaper JB. Construction of *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using of positive-selection suicide vector. Infect Immun. 1991;59:4310-4317. DOI: 10.1128/iai.59.12.4310-4317.1991
3. Selbitschka W, Niemann S, Puhler A. Construction of gene replacement vectors for Gram (-) bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;38:615-618.
4. Dentsovskaya SV, Ivanov SA, Kopylov PK, Shaikhutdinova RZ, Platonov ME, Kombarova TI, et al. Selective protective potency of *Yersinia pestis* Δ*nlpD*-mutants. Acta Naturae. 2015;7(1):102-108. (In Russian).
5. Fukushima H, Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar. J Clin Microbiol. 1986 Jul;24(1):116-20. DOI: 10.1128/jcm.24.1.116-120.1986
6. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat. 2010;13(4-5):132-8. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002
7. Titareva GM, Fursova NK, Balakhonov SV. Shtammovye otlichiya *Yersinia pestis* po chuvstvitel'nosti k bakteritsidnomu deistviyu polimiksina V. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2003;10:100. (In Russian).
8. Lebedeva MN. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po meditsinskoj mikrobiologii. Uchebnoe posobie. Medgiz, 1973. (In Russian).
9. Rukovodstvo po profilaktike chumy. Pod red. Naumova AV, Samoilovoi LV. Saratov, 1992. (In Russian).

Информация об авторах:

Шайхутдинова Рима Завдатовна, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Rima Z. Shaikhutdinova, senior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentsovskaya, MD, PhD, DSc, major researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

Pseudomonas aeruginosa является возбудителем широкого спектра острых и хронических инфекций. Основная причина персистенции инфекций, вызванных данным патогеном, связана со способностью бактерии образовывать биопленки. Одной из ведущих терапевтических стратегий для лечения инфекций, связанных с антибиотикоустойчивыми штаммами *P. aeruginosa* и их биопленками, является фаготерапия. Бактериофаги обладают способностью разрушать экзополисахаридный матрикс, обеспечивая доступ биоцидов к бактериальным клеткам. В данном исследовании определен потенциал комплексного использования бактериофагов и дезинфицирующих веществ различных классов против ассоциированных с поверхностью биопленок *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, разрушение биопленок, бактериофаги, дезинфицирующие вещества, экзополисахаридный матрикс

Для цитирования: Колупаева Н.В., Щербакова О.А., Колупаева Л.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Кузин В.В. Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2024; 9(4): 67–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-67-74

Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

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

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

Pseudomonas aeruginosa is an important pathogen causing a wide range of acute and chronic infections. The main cause of persistence of infections caused by this pathogen is related to the ability of the bacterium to form biofilms. One of the leading therapeutic strategies for the treatment of infections associated with antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa* and their biofilms is phage therapy. Bacteriophages have the ability to degrade the exopolysaccharide matrix, allowing biocide access to bacterial cells. In this study, the potential for the integrated use of bacteriophages and disinfectants of different classes against surface-associated *P. aeruginosa* biofilms was determined.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm destruction, bacteriophages, disinfectants, exopolysaccharide matrix

For citation: Kolupaeva N.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva L.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Kuzin V.V. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Bacteriology. 2024; 9(4): 67–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-67-74

Pseudomonas aeruginosa включена Всемирной организацией здравоохранения в список приоритетных бактериальных патогенов, для лечения которых необходимы исследования и разработка новых антибактериальных препаратов. Серьезной угрозой для общественного здравоохранения является появление и распространение антибиотико-

устойчивых изолятов *P. aeruginosa*. Кроме того, наблюдается одновременное повышение устойчивости патогена к дезинфицирующим средствам [1].

Бактерия является возбудителем широкого спектра острых и хронических заболеваний, таких как пневмония, муковисцидоз, бактериемия у пациентов с ожогами, септи-

Для корреспонденции:

Колупаева Надежда Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов 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) 31-2182

Статья поступила 20.09.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, 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) 31-2182

The article was received 20.09.2024, accepted for publication 25.12.2024

ческие отравления и персистирующие инфекции легких и ран [2]. Хронические инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, могут быть связаны со способностью данного микроба образовывать биопленки. Биопленка характеризуется наличием внеклеточного вещества – матрикса, который обеспечивает прикрепление клеток к поверхности, их коммуникацию, а также защиту от внешних воздействий. Наличие биопленки обуславливает устойчивость данного микроорганизма к широкому спектру антибиотиков и дезинфицирующих средств, а также к компонентам иммунной системы макроорганизма [3, 4]. В связи с этим существует острая потребность в поиске веществ, эффективных для борьбы с биопленками.

Доступной альтернативной антибактериальным препаратам является применение бактериофагов. Вирулентные фаги способны инфицировать бактериальные клетки за относительно короткие промежутки времени. Они проявляют специфичность к узкому или широкому кругу штаммов-хозяев и часто используются в виде коктейлей для воздействия на несколько штаммов или видов бактерий [4]. Кроме того, бактериофаги способны продуцировать внеклеточные ферменты, такие как деполимеразы, разрушающие экзополисахаридный матрикс биопленки и способствующие проникновению антимикробных веществ внутрь биопленки [5].

Перспективным направлением для предотвращения образования и разрушения биологических пленок является комбинированное использование бактериофагов и противомикробных веществ. Наиболее распространенными химическими противомикробными средствами, используемыми для борьбы с патогенами на различных поверхностях, являются дезинфицирующие средства [6]. Молекулы химических дезинфицирующих веществ (ДВ) способны связываться с бактериальной клеткой с помощью механизма сшивания макромолекул, коагуляции и окисления, нарушая структуру и функции клетки, что приводит к элиминации патогена [7]. Однако при образовании биопленок эффективность применения дезинфицирующих веществ может быть снижена в связи с низкой проницаемостью внеклеточного матрикса. В свою очередь бактериофаги обладают способностью гидролизовать матрикс биопленки, расщепляя полимеры, капсульные полисахариды и внеклеточную ДНК, прикрепляясь к бактериальным рецепторам и «внедрять» свои гены в протоплазму бактерий [8, 9]. Кроме того, специфичность бактериофагов ограничивает развитие резистентности к бактериальным мишеням внутри клеток [10]. В связи с этим комплексное применение бактериофагов и ДВ является перспективным методом борьбы с биопленками.

Цель исследования – оценка эффективности комплексного применения бактериофагов и дезинфицирующих веществ с целью разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования

В работе использовали клинические штаммы *P. aeruginosa*, выделенные в 2017–2020 гг. от пациентов НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н.Бурденко ($n = 37$), а также патогены, входящие в группу ESKAPE: *Enterococcus faecium*

($n = 1$), *Staphylococcus aureus* ($n = 6$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 17$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 12$), *P. aeruginosa* ($n = 48$) и *Enterobacter* sp. ($n = 1$), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». В качестве референс-штамма использовали лабораторный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, рекомендованный для тестирования дезинфицирующих средств [11]. Бактериальные культуры выращивали на плотных питательных средах при температуре 37°C в течение 24 ч. В работе использовали питательные среды: «Питательная среда №1 ГРМ-агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), Muller-Hinton broth (Himedia, Мумбаи, Индия), Luria Bertani broth (Difco, Детройт, США).

Бактериофаги

Бактериофаги выделяли из проб воды и почвы Московской, Воронежской и Рязанской областей методом обогащения. Наличие бактериофагов подтверждали двухслойным методом Грация [12]. Исследование специфичности выделенных фагов проводили на *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *Enterobacter* sp. Для оценки спектра литического действия использовали клинические штаммы *P. aeruginosa* ($n = 85$).

Определение чувствительности бактерий к бактериофагам проводили методом спот-тестирования (Spot-test). Бактериальные суспензии (10^9 КОЕ/мл) смешивали с полужидким агаром (0,5% агарозы) и распределяли по поверхности плотной питательной среды ГРМ-агар, вносили 10 мкл фильтрата фага и инкубировали посеы в течение 18–48 ч при температуре 37°C. Учет степени лизиса бактерий регистрировали по схеме «четыре креста». Штаммы, по отношению к которым активность бактериофагов оценивалась на «+++» и «++++», считались чувствительными.

Дезинфицирующие вещества

В работе использовали ДВ различных классов: алкилдиметилбензиламмония хлорид (АДБАХ), N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин (третичный амин), полигексаметиленгуанидин (ПГМГ), перекись водорода, диоксид хлора, дихлоризоцианурат натрия (ДХЦ) по активному хлору (по АХ), гипохлорит натрия, хлоргексидина гидрохлорид, глутаровый и ортофталевый альдегиды.

Получение биологических пленок *P. aeruginosa*

Для получения биологических пленок *P. aeruginosa* использовали метод аппликаторов [13]. Клетки культивировали в жидкой питательной среде до стационарной фазы ($OD_{600} = 0,5–0,6$ опт. ед.) при температуре 37°C, что соответствует $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Аликвотны полученных суспензий (0,1 мл) вносили на поверхность плотной питательной среды и инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Затем на поверхность биопленки накладывали аппликатор (10 × 10 мм) на 2–3 мин. Аппликатор с отпечатком биопленки использовали для оценки комплексного воздействия фагов и ДВ.

Определение эффективности бактериофагов для разрушения биопленок *P. aeruginosa*

Аппликаторы с отпечатками биопленок штаммов *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19 и *P. aeruginosa* ATCC 27 853 обрабатывали

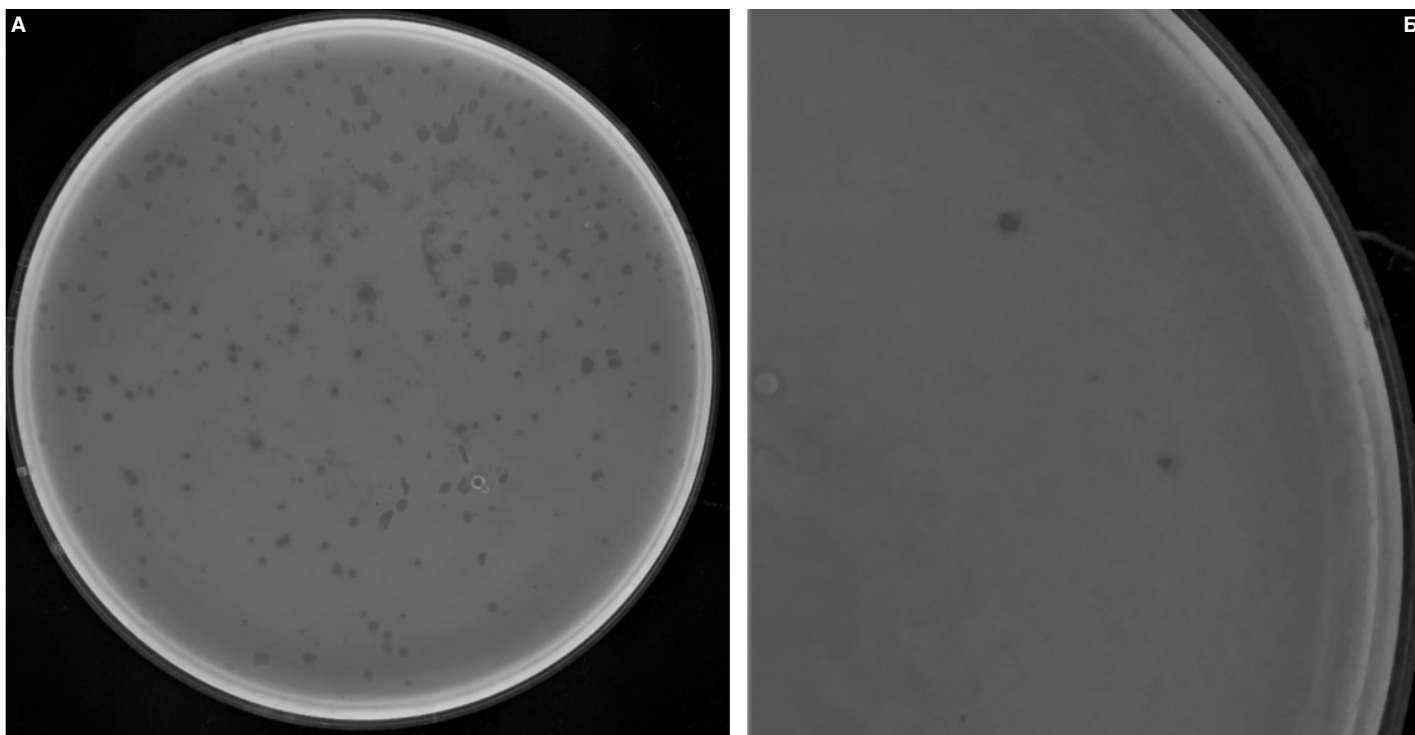


Рис 1. Негативные колонии бактериофагов, выделенные из проб воды и почвы (А); изолированные бляшки бактериофага Ph_2 (Б).
Fig. 1. Negative colonies of bacteriophages isolated from water and soil samples (A); isolated plaques of bacteriophage Ph_2 (B).

бактериофагами в течение 30 и 60 мин. Затем аппликатор переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37°C в течение 2–3 суток. Эффективность обработки оценивали по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Определение эффективности комплексного применения фагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *P. aeruginosa*

Аппликаторы с отпечатками биопленок обрабатывали бактериофагами в течение 30 мин. После обработки аппликаторы погружали в растворы ДВ на 15 мин. Далее аппликатор переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37°C в течение 2–3 суток. Эффективность обработки оценивали по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ)

Для окрашивания матрикса аппликаторы с отпечатком биопленки помещали в 8-луночный планшет, вносили краситель TOTO-1 (Thermo, США) и оставляли на 15 мин в темноте. Далее отбирали раствор первого красителя и добавляли краситель SYTO 60 red (Thermo, США) для окрашивания живых клеток. Через 15 мин образцы отмывали и фиксировали 0,25%-м раствором глutarового альдегида [14]. Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива 60x (объектив UPLXAP060XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры 488 и 561 нм для окрашенных SYTO 9 и SYTO 60 red образцов соответственно. Мощность лазеров составляла 10% от максимальной. Анализ образцов слепым методом и получение трехмерных

изображений проводили с интервалом по оси Z 0,36 мкм. Результаты анализировали в программе LSM Image Browser (NIH, США) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Дания).

Результаты исследования и их обсуждение

Выделение и характеристика бактериофагов, активных в отношении *P. aeruginosa*

Из проб воды и почвы Московской, Воронежской и Рязанской областей было выделено 20 бактериофагов. Все изолированные бактериофаги образовывали на бактериальных газонах мелкие бляшки с небольшими зонами ореола (рис. 1).

Результаты анализа специфичности и оценка спектра литической активности показали, что все выделенные фаги являются высокоспецифичными в отношении бактерий рода *P. aeruginosa* по сравнению с другими патогенами группы ESKAPE (табл. 1). Установлено, что наиболее выраженной литической активностью обладали бактериофаги Ph_2 (67,0%), Ph_4 (58,8%), Ph_6 (57,6%), Ph_10 (55,3%).

При культивировании бактериофаги Ph_2 и Ph_4 формировали на газоне референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 круглые негативные колонии диаметром 0,5 и 0,8 мм, фаги Ph_6 и Ph_10 образовывали прозрачные бляшки с ровным краем диаметром 0,8–2 мм и небольшим ореолом. Данные бактериофаги были выбраны для дальнейшего исследования специфической активности в отношении биопленок *P. aeruginosa*.

Воздействие бактериофагов на биопленки *P. aeruginosa*

Для моделирования биопленок использовали штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* F-19-4pa/19, кото-

Таблица 1. Стабильность и спектр литической активности выделенных бактериофагов в отношении ESKAPE-патогенов
 Table 1. Stability and spectrum of lytic activity of isolated bacteriophages against ESKAPE pathogens

Вид бактерий / <i>Bacteria species</i>	Кол-во / Number	Количество штаммов, чувствительных к бактериофагам / Number of strains sensitive to bacteriophages									
		Ph_1	Ph_2	Ph_3	Ph_4	Ph_5	Ph_6	Ph_7	Ph_8	Ph_9	Ph_10
Бактериофаг / <i>Bacteriophage</i>											
<i>P. aeruginosa</i>	85	27	57	10	50	20	49	9	33	34	47
<i>E. faecium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бактериофаг / <i>Bacteriophage</i>											
<i>P. aeruginosa</i>	85	24	27	17	28	35	15	16	32	25	42
<i>E. faecium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

рые обладали самой высокой интенсивностью образования биопленки и были наиболее устойчивыми к большинству исследуемых ДВ, по данным ранее проведенных исследований [15].

Для изучения активности фагов в отношении биологических пленок использовали метод аппликаторов, позволяющий проводить прямую оценку выживаемости бактерий в составе биопленок. Аппликаторы с отпечатком биопленки обрабатывали бактериофагами в течение 30 и 60 мин и помещали в пробирки с жидкой средой. Эффективность применения бактериофагов оценивали по наличию или отсутствию роста в жидкой питательной среде. Воздействие бактериофага на структуру биопленку оценивали при помощи ЛСКМ.

Под воздействием всех исследуемых бактериофагов наблюдали помутнение жидкой питательной среды в пробирках с аппликатором, что указывает на остаточное количество жизнеспособных клеток на аппликаторе. Несмотря на высокую литическую активность бактериофагов Ph_2, Ph_4, Ph_6, Ph_10 в отношении планктонных форм, обработка данными фагами не приводила к полному разрушению биопленок *P. aeruginosa*.

При анализе биопленки выявлена характерная трехмерная структура организации. Толщина сформированной биопленки колебалась в пределах 30–40 мкм (рис. 2). На изображениях поперечных оптических срезов была хорошо видна периферическая локализация бактериальных агрегатов, расположенных в хаотичном порядке. Схожие данные о формировании биологических пленок описаны в исследовании американских ученых, опубликованном в 2019 г. [16].

При воздействии бактериофага Ph_6 в течении 30 мин наблюдали разрушение экзополисахаридного матрикса и снижение толщины биопленок до 10 мкм. Однако действие фага не затрагивало бактериальные клетки, расположенные внутри биопленки. При увеличении времени воздействия до 60 мин отмечали частичный лизис бактериальных клеток, расположенных в верхних слоях биопленки. Поскольку бак-

териофаги разрушают экзополисахаридный матрикс биопленки с помощью ЭПС-деполимераз, согласно данным, опубликованным В.К.Chan et al. [17], можно предположить, что у всех исследуемых фагов присутствовали схожие ферменты.

Комплексное применение фагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биологических пленок

Для оценки эффективности комплексного применения фагов и ДВ на тест-объекты со сформированной биопленкой наносили суспензию бактериофага и через 30 мин аппликаторы обрабатывали растворами ДВ. Эффективность комплексной обработки оценивали по наличию или отсутствию роста в жидкой питательной среде. Изменение структуры биопленки в процессе обработки оценивали при помощи ЛСКМ.

Предварительная обработка биопленок бактериофагами позволяет снизить значения показателей минимальных бактерицидных концентраций (МБК) ДВ, необходимых для разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*, от 2 до 25 раз в зависимости от вида применяемого ДВ (табл. 2, 3).

Результаты исследований показали, что биопленка, сформированная клиническим штаммом *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19, была более устойчива к применяемой химической дезинфекции, чем сформированная референс-штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853. Наиболее эффективным бактериофагом оказался Ph_6. Его применение совместно с ДВ способствовало снижению МБК всех исследуемых соединений до минимальных значений. Аналогичные данные, описывающие эффективность комплексного использования фагов и химических дезинфицирующих средств для улучшения инактивации ассоциированных с поверхностью биопленок *P. aeruginosa*, были получены E.Stachler et al. [18].

Предварительная обработка биопленок бактериофагами снижала значение МБК АДБАХ в 3 раза (при использовании Ph_2 и Ph_4) и в 10 раз (при использовании Ph_6 и Ph_10) по сравнению со значением МБК данного биоцида без при-

Таблица 2. Комплексное применение бактериофагов и дезинфектантов для разрушения биопленки, сформированной *P. aeruginosa* ATCC 27853

Table 2. Integrated application of bacteriophages and disinfectants to disrupt biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853

Действующее вещество / Active ingredient	Концентрация раствора по действующему веществу, % / Solution concentration of active substance, %					
	Планктонная культура / Planktonic culture	без обработки / without processing	Биопленка / Biofilm			
			Ph_2	Ph_4	Ph_6	Ph_10
АДБАХ / ADBAC	0,05	1,0	0,3	0,3	0,1	0,1
ПГМГ / PHMG	0,03	0,8	0,2	0,2	0,1	0,1
Третичный амин / Tertiary amine	0,01	0,5	0,03	0,05	0,02	0,02
Перекись водорода / Hydrogen peroxide	2,0	5,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Диоксид хлора / Chlorine dioxide	0,02	0,1	0,02	0,05	0,02	0,02
Хлоргексидин / Chlorhexidine	0,05	1,0	0,1	0,05	0,05	0,1
Гипохлорит натрия / Sodium hypochlorite	0,075	0,2	0,075	0,1	0,075	0,075
ДХЦ (по АХ) / DCC (by AC)	0,0075	0,03	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075
Глутаровый альдегид / Glutaraldehyde	0,25	2,5	0,25	0,5	0,25	0,5
Ортофталевый альдегид / Orthophthalic aldehyde	0,1	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2

АДБАХ – алкилдиметилбензиламмония хлорид; ПГМГ – полигексаметиленгуанидин; ДХЦ (по АХ) – дихлороизоциануровая кислота (по активному хлору).
 ADBAC – alkyl dimethylbenzylammonium; PHMG – polyhexamethylene guanidine; DCC (by AC) – dichloroisocyanuric acid (by active chlorine).

Таблица 3. Комплексное применение бактериофагов и дезинфектантов для разрушения биопленки, сформированной *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19

Table 3. Complex use of bacteriophages and disinfectants to destroy biofilm formed by *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19

Действующее вещество / Active ingredient	Концентрация раствора по действующему веществу, % / Solution concentration of active substance, %					
	Планктонная культура / Planktonic culture	без обработки / without processing	Биопленка / Biofilm			
			Ph_2	Ph_4	Ph_6	Ph_10
АДБАХ / ADBAC	0,05	1,0	0,3	0,3	0,1	0,1
ПГМГ / PHMG	0,03	0,8	0,2	0,2	0,1	0,1
Третичный амин / Tertiary amine	0,01	0,5	0,03	0,05	0,02	0,03
Перекись водорода / Hydrogen peroxide	2,0	5,0	2,0	3,0	2,0	3,0
Диоксид хлора / Chlorine dioxide	0,02	0,1	0,02	0,05	0,02	0,02
Хлоргексидин / Chlorhexidine	0,05	1,0	0,05	0,05	0,05	0,1
Гипохлорит натрия / Sodium hypochlorite	0,075	0,2	0,1	0,1	0,075	0,075
ДХЦ (по АХ) / DCC (by AC)	0,0075	0,03	0,0015	0,0075	0,0075	0,0075
Глутаровый альдегид / Glutaraldehyde	0,25	2,5	0,25	0,5	0,25	0,5
Ортофталевый альдегид / Orthophthalic aldehyde	0,1	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2

Сокращения те же, что в табл. 2. / The abbreviations are the same as in Table 2.

менения фага. Схожие результаты были получены В.Рой et al. при исследовании влияния комплексного действия четвертичных аммониевых соединений и бактериофагов на биопленки *Listeria monocytogenes* [19]. ПГМГ обладал большей эффективностью при совместном применении с фагами Ph_6 и Ph_10. Для третичного амина установлено самое значительное снижение показателя МБК при фаговой обработке по сравнению со всеми исследуемыми ДВ – до 25 раз.

Применение бактериофагов Ph_4 и Ph_6 позволяло снизить МБК хлоргексидина в отношении биопленки до значений МБК планктонной культуры. В исследовании D.Lee et al. показано, что комбинированная обработка фагом HEf13 и

хлоргексидином приводила к ингибированию образования и разрушению биопленки, сформированной *Enterococcus faecalis* [20].

Применение фагов Ph_2 и Ph_6 совместно с кислородактивными соединениями (перекись водорода и диоксид хлора) позволило снизить значения МБК данных биоцидов в отношении биопленок до значений МБК планктонной культуры. При этом предварительная обработка биопленок бактериофагом Ph_2 была менее эффективна при совместном применении с хлорактивными соединениями (ДХЦ и гипохлорит натрия). Схожие данные приведены в работе Y.Zhang et al., где показано, что комбинированная обработка био-

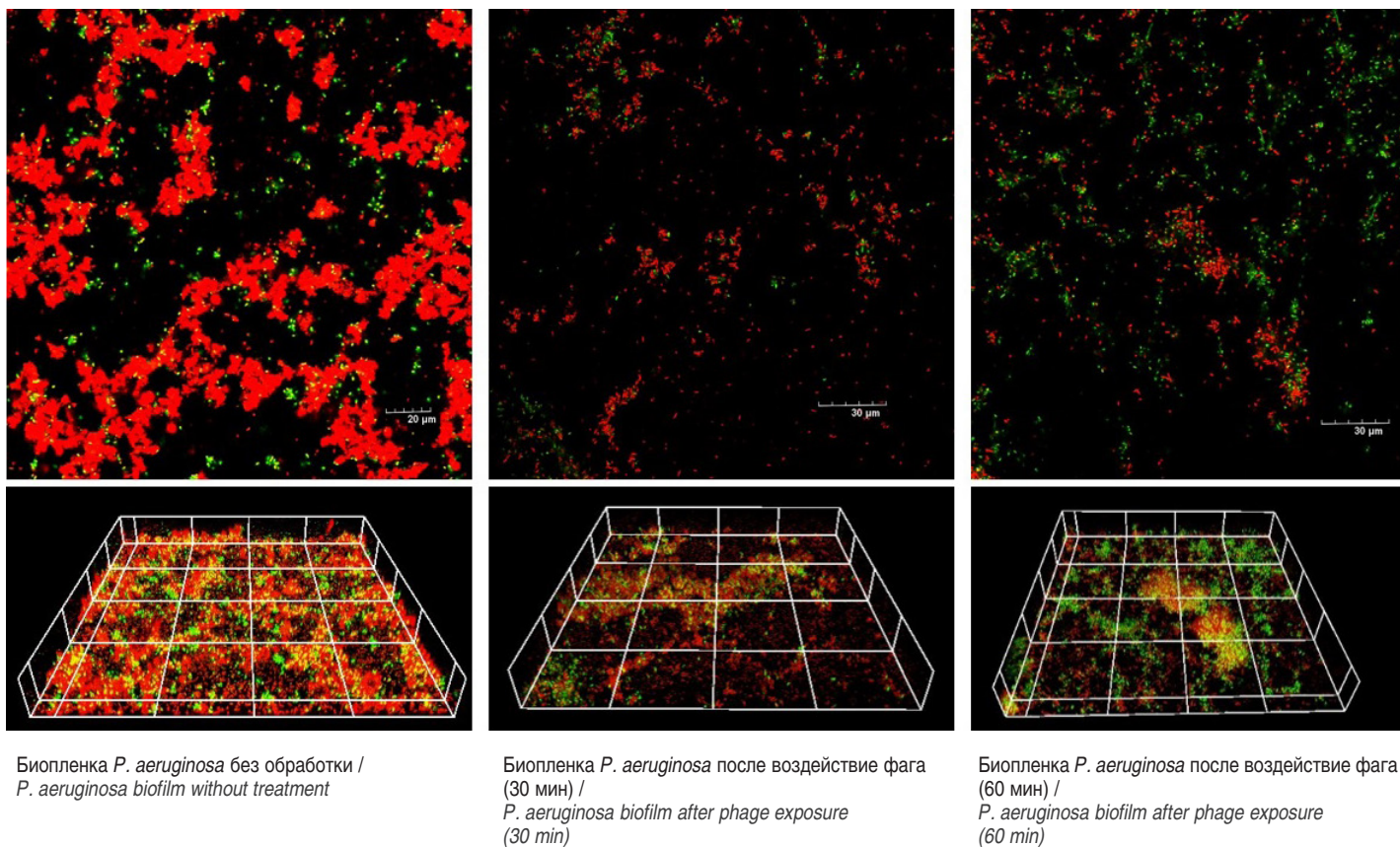


Рис. 2. Эффективность разрушения биопленок с помощью фагов.
 Fig. 2. Efficiency of biofilm destruction using phages.

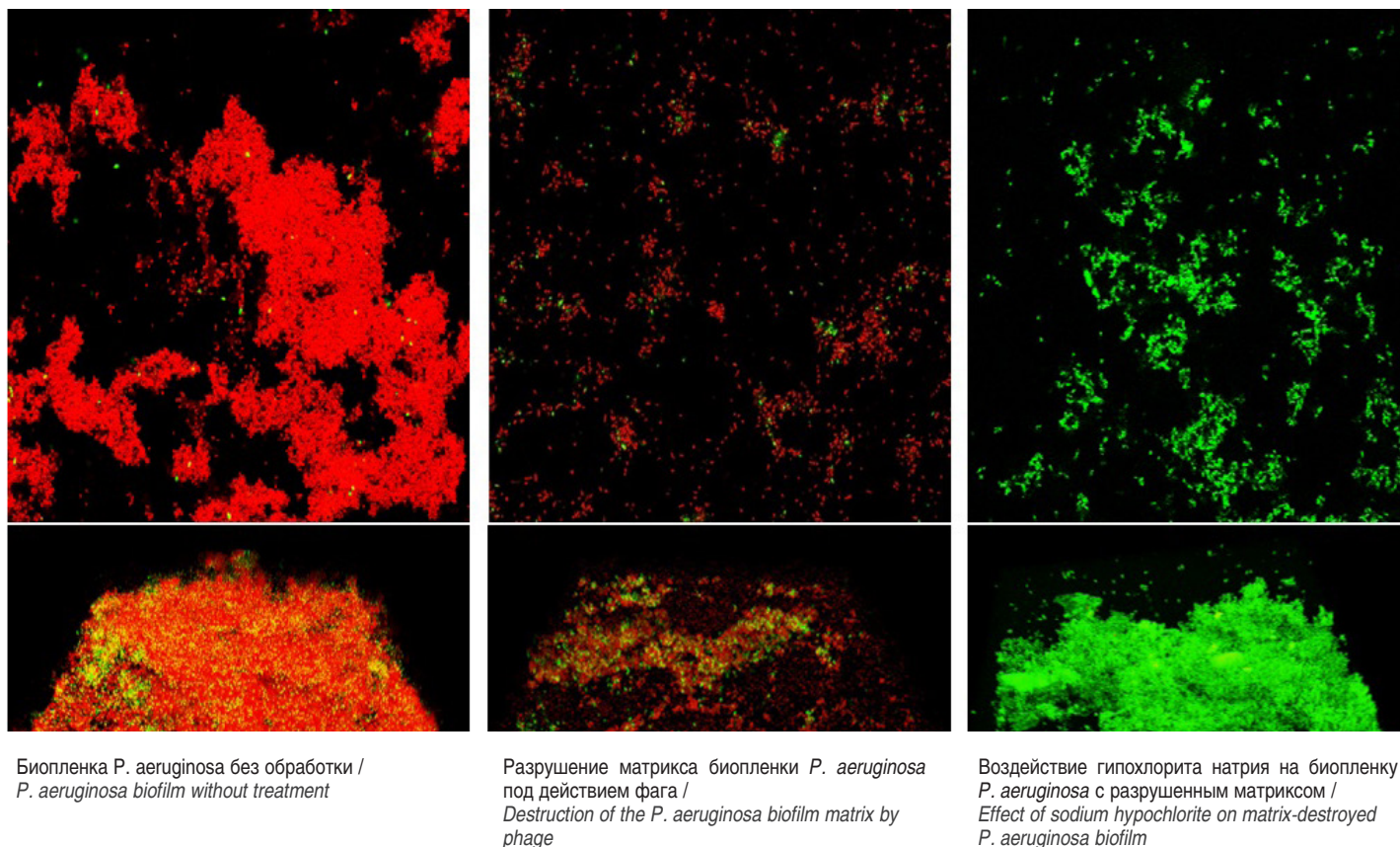


Рис. 3. Этапы деградации биологической пленки *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19 под воздействием фага Ph_6 и 0,075%-го раствора гипохлорита натрия.
 Fig. 3. Stages of degradation of the biological film *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19 under the influence of the phage Ph_6 and 0.075% sodium hypochlorite solution.

пленок бактериофагами и гипохлоритом натрия приводит к удалению $96 \pm 1\%$ биопленок *P. aeruginosa* с поверхностей [21]. Также в исследовании M.Chandra et al. было выявлено, что одновременная обработка фагом и гипохлоритом натрия приводит к полному разрушению биопленки *Salmonella enterica* серовара *Typhimurium*, в то время как их применение по отдельности не позволяет полностью удалить биопленки [22].

Комплексное применение фагов Ph_2, Ph_6 и альдегидов позволило снизить значения МБК данных биоцидов в отношении биопленок до значений МБК планктонной культуры. Полученные данные согласуются с результатами исследования Z.H.Liu et al., в котором описана эффективность комплексного использования фага и глутарового альдегида с целью предотвращения образования биопленки [23].

Изменение структуры биопленки при комплексной обработке оценивали с помощью ЛСКМ. На рис. 3 показано, что при воздействии бактериофага Ph_6 на биопленку, сформированную *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19, наблюдалось характерное снижение толщины биопленки, вызванное разрушением экзополисахаридного матрикса. Последующая обработка 0,075%-м раствором гипохлоритом натрия (МБК в отношении планктонной культуры) приводила к потере жизнеспособности всех бактериальных клеток, локализованных в биопленке.

Полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работе Yin et al. В исследовании показано, что фаги могут диспергировать внеклеточный матрикс и увеличивать его проницаемость благодаря ферментам, разрушающим экзополисахариды, что позволяет биоцидам достигать внутреннего слоя биопленки [24]. Это обуславливает возможность использования выделенных бактериофагов для разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*.

Заключение

В результате работы были выделены высокоспецифичные бактериофаги Ph_2, Ph_4, Ph_6 и Ph_10, обладающие выраженной литической активностью в отношении *P. aeruginosa*. Воздействие данных фагов на биопленки *P. aeruginosa* приводило к разрушению экзополисахаридного матрикса, что, предположительно, обусловлено наличием ферментов ЭПС-деполимераз у выделенных бактериофагов. Установлено, что предварительная обработка биологических пленок бактериофагами обеспечивает проникновение ДВ во внутренние слои биопленки, позволяя снизить значения МБК используемых биоцидов в отношении биопленок до показателей МБК планктонной культуры. Таким образом, комплексное применение бактериофагов и ДВ с целью разрушения биологических пленок может являться эффективной стратегией в борьбе с биоопленкообразующими патогенами в лечебных учреждениях.

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 / References

1. Rakshit P, Singh A, Singh R, Banerjee T. An in-depth study on survival mechanism of bacterial isolates in disinfectants within the hospital environment. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024 Aug 15;14:1442914. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1442914
2. Vohra M, Kour A, Kalia NP, Kumar M, Sharma S, Jaglan S, et al. A comprehensive review of genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomic insights into the differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from the planktonic to biofilm state: A multi-omics approach. *Int J Biol Macromol.* 2024 Feb;257(Pt1):128563. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128563
3. da Cruz Nizer WS, Allison KN, Adams ME, Vargas MA, Ahmed D, Beaulieu C, et al. The role of exopolysaccharides Psl and Pel in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to the oxidative stressors sodium hypochlorite and hydrogen peroxide. *Microbiol Spectr.* 2024 Oct 3;12(10):e0092224. DOI: 10.1128/spectrum.00922-24
4. Santiago AJ, Donlan RM. Bacteriophage Infections of Biofilms of Health Care-Associated Pathogens: *Klebsiella pneumoniae*. *EcoSal Plus.* 2020 Oct;9(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0029-2019. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0029-2019
5. Santiago AJ, Burgos-Garay ML, Kartforosh L, Mazher M, Donlan RM. Bacteriophage treatment of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a multispecies biofilm: a potential biocontrol strategy for healthcare facilities. *AIMS Microbiol.* 2020 Feb 26;6(1):43-63. DOI: 10.3934/microbiol.2020003
6. Byun KH, Han SH, Choi MW, Kim BH, Ha SD. Efficacy of disinfectant and bacteriophage mixture against planktonic and biofilm state of *Listeria monocytogenes* to control in the food industry. *Int J Food Microbiol.* 2024 Mar 2;413:110587. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110587
7. Donaghy JA, Jagadeesan B, Goodburn K, Grunwald L, Jensen ON, Jespers AD, et al. Relationship of Sanitizers, Disinfectants, and Cleaning Agents with Antimicrobial Resistance. *J Food Prot.* 2019 May;82(5):889-902. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-373
8. Talapko J, Škrlec I. The Principles, Mechanisms, and Benefits of Unconventional Agents in the Treatment of Biofilm Infection. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020 Oct 10;13(10):299. DOI: 10.3390/ph13100299
9. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Bekić S. From Bacteriophage to Antibiotics and Back. *Coll. Antropol.* 2018;42:131-138.
10. Ferriol-González C, Domingo-Calap P. Phages for Biofilm Removal. *Antibiotics (Basel).* 2020 May 21;9(5):268. DOI: 10.3390/antibiotics9050268
11. Руководство Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. М., 2021. / Rukovodstvo R 4.2.3676-20. Metody laboratornykh issledovaniy i ispytaniy dezinfektsionnykh sredstv dlya otsenki ikh effektivnosti i bezopasnosti. М., 2021. (In Russian).
12. Adams MH. *Bacteriophages*; Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1959.
13. Детушева ЕВ, Ершова ОН, Фурсова НК. Чувствительность планктонных культур и биопленок грамотрицательных бактерий к коммерческим препаратам дезинфектантов и антисептиков. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021;66(7):438-447. / Detusheva EV, Ershova ON, Fursova NK. The sensitivity of planktonic cultures and biofilms of gram-negative bacteria to commercial disinfectant and antiseptic preparations. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2021;66(7):438-447. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447 (In Russian).
14. Diuvenji EV, Nevolina ED, Mart'yanov SV, Zhurina MA, Kalmantaeva OV, Makarova MA, et al. Binary Biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide. *Microbiology.* 2022;91(5):563-576. DOI: 10.1134/S002626172260118X

15. Кузин ВВ, Колупаева НВ, Щербаква ОА, Колупаева ЛВ, Грищенко НС, Рудницкая ТИ, и др. Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация. Бактериология. 2023;8(4):28-35. / Kuzin VV, Kolupaeva NV, Shcherbakova OA, Kolupaeva LV, Grishchenko NS, Rudnitskaya TI, et al. Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation. Bacteriology. 2023;8(4):28-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-28-35 (In Russian).
16. Reichhardt C, Parsek MR. Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. Front Microbiol. 2019 Apr 2;10:677. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00677
17. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. Curr Pharm Des. 2015;21(1):85-99. DOI: 10.2174/1381612820666140905112311
18. Stachler E, Kull A, Julian TR. Bacteriophage Treatment before Chemical Disinfection Can Enhance Removal of Plastic-Surface-Associated *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 2021 Sep 28;87(20):e0098021. DOI: 10.1128/AEM.00980-21
19. Roy B, Ackermann HW, Pandian S, Picard G, Goulet J. Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriophages and a quaternary ammonium compound. Appl Environ Microbiol. 1993 Sep;59(9):2914-7. DOI: 10.1128/aem.59.9.2914-2917.1993
20. Lee D, Im J, Kim AR, Jun W, Yun CH, Han SH. Enterococcus Phage vB_EfaS_HEf13 as an Anti-Biofilm Agent Against *Enterococcus faecalis*. J Microbiol. 2024 Aug;62(8):683-693. DOI: 10.1007/s12275-024-00150-z
21. Zhang Y, Hu Z. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. Biotechnol Bioeng. 2013 Jan;110(1):286-95. DOI: 10.1002/bit.24630
22. Chandra M, Thakur S, Chougule SS, et al. Combined effect of disinfectant and phage on the survivability of *S. Typhimurium* and its biofilm phenotype. Internet J Food Saf. 2015;17:25-31.
23. Liu ZH, Chiang MT, Lin HY. Lytic Bacteriophage as a Biomaterial to Prevent Biofilm Formation and Promote Neural Growth. Tissue Eng Regen Med. 2022 Oct;19(5):987-1000. DOI: 10.1007/s13770-022-00462-4
24. Yin R, Cheng J, Wang J, Li P, Lin J. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. Front Microbiol. 2022 Aug 26;13:955286. DOI: 10.3389/fmicb.2022.955286

Информация о соавторах:

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

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

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

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

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

Information about co-authors:

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

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

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

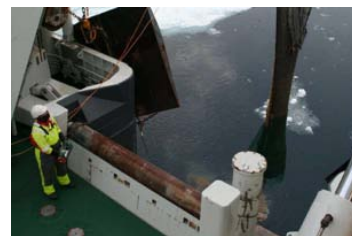
Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

НОВОСТИ НАУКИ

Перспективные кандидаты на антибиотики обнаружены в микробах, обитающих в глубинах Северного Ледовитого океана

Значительное количество антибактериальных агентов получают из бактериальных метаболитов. Аналогичным образом, многочисленные известные соединения, которые препятствуют бактериальной вирулентности, происходят из бактериальных метаболитов. Энтеропатогенная *Escherichia coli* (EPEC) является значимым патогеном человека, вызывающим кишечные инфекции, особенно влияющим на детскую смертность в развивающихся регионах. Эти инфекции характеризуются стиранием микроворсинок и поражением кишечного эпителия, связанными с aberrантной полимеризацией актина. Целью данного исследования было выявление потенциальных противобактериальных соединений для инфекций EPEC среди бактериальных метаболитов, собранных из морских актинобактерий (*Kocuria* sp. и *Rhodococcus* spp.) из Арктического моря, путем применения скрининговых анализов на основе вирулентности. Более того, продемонстрирована пригодность этих противобактериальных анализов для скрининга фракций экстракта актинобактерий для идентификации метаболитов с помощью биопроб. Обнаружено соединение в пятой фракции штамма *Kocuria*, которое препятствует полимеризации актина, вызванной EPEC, не влияя на рост. Кроме того, в пятой фракции штамма *Rhodococcus* было идентифицировано ингибирующее рост соединение. Эти результаты включают идентификацию, управляемую биоанализом, депликацию на основе ВЭЖХ-МС и выделение большого фосфолипида и вероятного антимикробного пептида, демонстрируя полезность этого подхода в скрининге соединений, способных ингибировать вирулентность EPEC.



Pylkkö T, Schneider YK, Rämä T, Andersen JH, Tammela P.
Bioprospecting of inhibitors of EPEC virulence from metabolites of marine actinobacteria from the Arctic Sea.
Front Microbiol. 2024 Aug 30;15:1432475. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1432475

INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

А.А.Ковалевич, А.С.Водопьянов, С.О.Водопьянов, С.Ю.Темякова

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

В последние годы широкое практическое применение для внутривидовой характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа, обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с фенотипическими методами типирования. Целью исследования являлся поиск INDEL-локусов и типирование с их помощью штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Нами были идентифицированы 10 INDEL-локусов, позволяющих проводить внутривидовое типирование *P. aeruginosa*. Генотипирование 268 штаммов, включенных в анализ, по 10 INDEL-локусам позволило выявить 54 уникальных генотипа. По итогам кластерного анализа все генотипы были сгруппированы в 5 кластеров. При этом гомология штаммов по сиквенс-типу или серотипу не влияла на дифференциацию штаммов по генотипам. Установлено, что разработанная схема может как выступать самостоятельным методом типирования, так и дополнять другие методы, такие как серотипирование и MLST-анализ. В последнем случае INDEL-типирование повышает дискриминирующую силу проводимого анализа. INDEL-типирование *P. aeruginosa* является полезным инструментом для изучения молекулярной эпидемиологии и генетики синегнойной инфекции, позволяющим выявлять особенности распространения возбудителя. Показано, что разработанная методика предоставляет возможность проводить внутривидовое генотипирование штаммов *P. aeruginosa* и дифференцировать различные клоны возбудителя, что может быть полезным для эпидемиологического расследования внутрибольничных очагов. Установлена циркуляция различных INDEL-генотипов штаммов *P. aeruginosa* на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: INDEL, *Pseudomonas aeruginosa*, генотипирование, синегнойная палочка, INDEL-типирование

Для цитирования: Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Темякова С.Ю. INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2024; 9(4): 75–81. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81

INDEL-typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains

A.A.Kovalevich, A.S.Vodopyanov, S.O.Vodopyanov, S.U.Temyakova

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

In recent years, methods of molecular genetic analysis, which have a greater differentiating ability compared with phenotypic typing methods, have been widely used for intraspecific characterization of microorganisms. The aim of the study was to search for INDEL loci and type *Pseudomonas aeruginosa* strains using them. We have identified 10 INDEL loci that allow intraspecific typing of *P. aeruginosa*. Genotyping of 268 strains included in the analysis for 10 INDEL loci revealed 54 unique genotypes. According to the results of the cluster analysis, all genotypes were grouped into 5 clusters. At the same time, the homology of strains by sequence type or serotype did not affect the differentiation of strains into different genotypes. It is established that the developed scheme can act as an independent typing method, and complement other methods such as serotyping and MLST analysis. In the latter case, INDEL typing increases the discriminating power of the analysis performed. INDEL-typing *P. aeruginosa* is a useful tool for studying the molecular epidemiology and genetics of pseudomonas aeruginosa infection, which allows us to identify the features of the spread of the pathogen. It is shown that the developed technique provides an opportunity to carry out intraspecific genotyping of *P. aeruginosa* strains and differentiate different clones of the pathogen, which may be useful for the epidemiological investigation of nosocomial foci. The circulation of various INDEL genotypes of *P. aeruginosa* strains in the territory of the Russian Federation has been established.

Key words: INDEL, *Pseudomonas aeruginosa*, genotyping, INDEL typing

For citation: Kovalevich A.A., Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Temyakova S.U. INDEL-typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains. Bacteriology. 2024; 9(4): 75–81. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81

Для корреспонденции:

Ковалевич Алексей Александрович, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Телефон: (863) 240-91-33

E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru

Статья поступила 22.05.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Alexey A. Kovalevich, Junior Researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

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

Phone: (863) 240-9133

E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru

The article was received 22.05.2024, accepted for publication 25.12.2024

В последние годы широкое практическое применение для внутривидовой характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа (MLST-, SNP-, VNTR-типирование), обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с фенотипическими методами типирования.

Важно отметить, что такие методы типирования должны обладать способностью отличать индивидуальные клоны возбудителя. В то же время методы должны быть недорогими, быстрыми, с высокой воспроизводимостью, простыми в применении и интерпретации [1].

На фоне новой коронавирусной инфекции, характеризующейся острым респираторным синдромом, одной из проблем стали бактериальные ко-инфекции, в т.ч. вызванные *Pseudomonas aeruginosa* [2, 3], который является условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим внутрибольничные инфекции (пневмония, инфекции мочевыводящих путей, инфекции ожоговых ран), особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, *P. aeruginosa* является одной из значимых причин инвалидности и летального исхода пациентов с муковисцидозом [4].

Очевидно, что оперативное расследование вспышек заболеваний невозможно без методов, позволяющих дифференцировать различные клоны возбудителя. Важно отметить, что весьма значимым фактором в условиях санкций против Российской Федерации является зависимость различных методик от импортного оборудования и расходных материалов, что может стать существенной проблемой при применении методов, основанных на секвенировании.

Одним из удобных методов молекулярно-генетического типирования является VNTR-анализ, основанный на определении кратности вариабельных тандемных повторов. Однако его нельзя проводить *in silico* в том случае, если геномы получены по технологии «коротких ридов», что существенно ограничивает возможности по сопоставлению данных, полученных разными группами исследователей.

Мультилокусное сиквенс-типирование (Multilocus sequence typing/MLST) основано на определении нуклеотидных последовательностей участков нескольких генов «домашнего хозяйства» (т.е. генов, кодирующих белки, необходимые для выполнения базовых метаболических функций клетки), локализованных на бактериальной хромосоме (чтобы избежать влияния плазмидного профиля на результаты генотипирования) [5]. Основным принцип заключается в анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в 7 хромосомных локусах (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* и *trpE*), используемых в существующей схеме мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) *P. aeruginosa* для определения уникальных комбинаций полиморфизмов. Метод обеспечивает возможность высокопроизводительного типирования изолятов и определения их принадлежности к известным сиквенс-типам (ST) и клональным комплексам (CC), включая так называемые «международные клоны высокого риска» [6].

Это делает актуальной разработку методик, не зависящих от зарубежных поставок и баз данных. В этом плане весьма удобным представляется метод молекулярного INDEL-типирования, основанный на выявлении коротких вставок/делеций (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов.

Представленная методика широко используется для генотипирования различных микро- и макроорганизмов [7–10]. Однако сведений об использовании приема INDEL-типирования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на модели синегнойной палочки мы не встретили.

Существующие работы по использованию INDEL-маркеров посвящены исследованию парных изолятов от нескольких пациентов и используют не ПЦР, а данные полногеномного секвенирования [11].

В связи с этим **цель** работы состояла в поиске INDEL-маркеров, позволяющих проводить генотипирование как *in silico* (на основе данных секвенирования), так и *in vitro* (с использованием ПЦР), и анализе с их помощью коллекции штаммов *P. aeruginosa*, изолированных из биологического материала и объектов окружающей среды в различных субъектах Российской Федерации.

Материалы и методы

В работе использовали 22 штамма *P. aeruginosa*, полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Штаммы выделены в Ростове-на-Дону, Хабаровске, Мариуполе в период с 2022 по 2023 г. Полногеномное секвенирование проведено в ходе реализации федерального проекта социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Для сравнительного анализа использовали 246 полных геномов штаммов, изолированных на территории Российской Федерации в период с 2006 по 2020 г., полученных из международной базы NCBI.

Конструирование праймеров осуществляли с помощью программы Primer3.

Постановку ПЦР проводили с использованием реакционной смеси объемом 10 мкл из расчета: 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смеси дНТФ, 1,0 мкМ смеси праймеров (по 0,5 мкМ каждого праймера) 25 нг ДНК матрицы, 1 ед. ДНК-полимеразы, оставшийся объем – деионизованная вода, свободная от нуклеаз. В качестве матрицы использовали геномную ДНК (концентрация 3 нг/мкл), полученную из штаммов *P. aeruginosa*. Учет результатов амплификации проводили с помощью электрофореза в 8%-м полиакриламидном геле с использованием маркера молекулярных масс ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере CFX96 (Bio-Rad). Термальный режим начальной денатурации при 94°C в течение 3 мин, затем 39 циклов при соблюдении температурно-временного режима: денатурация при 94°C – 10 с, отжиг праймеров при 63°C в течение 10 с, элонгация при 72°C – 15 с.

Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторской программы по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [12].

Анализ данных полногеномного секвенирования проводили с помощью пакета программ BLAST и авторской программы (<http://antiplague.ru/pseudomonas-analyser>) [13]. Идентификация серогруппы была проведена с помощью

программы *Pseudomonas Analyser*. Анализ ST-типов проводили с использованием авторской программы MLST typer (<http://antiplague.ru/mlst-typer>) [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Первый этап работы состоял в поиске INDEL-маркеров, позволяющих проводить внутривидовое генотипирование штаммов *P. aeruginosa*. С этой целью нами были отобраны 20 случайных геномов и проведен анализ по каждому гену, представленному в референс-геноме PAO1 (NCBI Accession Number GCF_000006765). Это позволило выявить гены, отличающиеся у разных штаммов за счет делеций и вставок. По итогам выравнивания данных генов были разработаны праймеры, фланкирующие выявленные вставки/делеции (таблица), что дало возможность дифференцировать штаммы по размеру получаемого ампликона.

Разработанные праймеры были апробированы *in vitro* на штаммах из коллекции ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (рис. 1). Для анализа INDEL-маркеров в геномах *P. aeruginosa in silico* нуклеотидные последовательности сконструированных нами праймеров были внесены в ранее разработанную программу *Pseudomonas Analyser*. Данные проведенного анализа с помощью программы (*in silico*) и ПЦР-методом (*in vitro*) полностью совпали. Это дает возможность проводить анализ не только *in silico*, используя разработанную программу, но и осуществлять исследования без использования полногеномного секвенирования.

Изученные нами штаммы образовали 54 INDEL-генотипа, которые были сгруппированы в 5 кластеров (А, В, С, D, E). Наиболее представительный кластер А, в свою очередь, был разделен на 3 субкластера (Аа, Ab и Ас) (рис. 2).

Для проведения сравнительного анализа были определены серотипы и MLST (ST) типы изучаемых штаммов на осно-

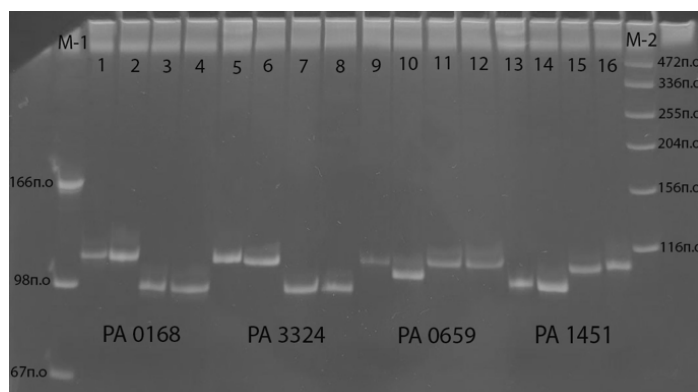


Рис. 1. Электрофореграмма с примером тестирования продуктов амплификации INDEL-генов: PA0168, PA3324, PA0659, PA1451. M-1 и M-2 – маркеры с обозначениями их молекулярно-массового размера. Нумерация от 1 до 16 соответствует номерам штаммов: 1, 5, 9, 13 – 2308 (Мариуполь), 2, 6, 10, 14 – 2350 (Мариуполь), 3, 7, 11, 15 – 21-122 (Хабаровск), 4, 8, 12, 16 – 21-52 (Хабаровск).

Fig. 1. Electropherogram with an example of testing the amplification products of INDEL genes: PA0168, PA3324, PA0659, PA1451. M-1 and M-2 are markers with designations of their molecular weight size. In Figure 1, the numbering from 1-16 corresponds to the strain numbers: 1, 5, 9, 13 – 2308 (Mariupol), 2, 6, 10, 14 – 2350 (Mariupol), 3, 7, 11, 15 – 21-122 (Khabarovsk), 4, 8, 12, 16 – 21-52 (Khabarovsk).

Таблица. INDEL-локусы, специфические праймеры и размер INDEL-аллелей *Pseudomonas aeruginosa*
Table. INDEL loci, specific primers and size of INDEL alleles of *Pseudomonas aeruginosa*

№	Обозначение / Designation	Структура праймеров 3'-5' / Structure of primers 3'-5'	Размер ампликона, п.о. / Amplicon size, bp
1	PA0168	AGGACATGGACTGCGTGG CCTGCTGCAGGCACTTGG	100/114/0
2	PA3324	GAGTCCCGGATGTGGTAGTC GATCACGCTCCACAGTTGA	113/99/
3	PA0659	GCGGCATCATCATCGAGAAG CTGGGCGGTGTGTAGGGA	106/112
4	PA1451	CAATTTTCAGCGCCGGCGG CGAAGACGAAGTGGACGAAC	100/109
5	PA4603	GACAGGAACGCATTGATCGG TCCGGCTGCGTGAGGATC	91/104/0
6	PA0240	CTCTGCGCTTCCCTCTGC GCGGTGCAGGTGGAAATTG	108/123
7	PA2249	GTGGGCGGCGAAGTATC GGCTCCCTTCGGTTTCTCC	102/117/0
8	PA0911	TCATGTTGATCAGTCGTCGC GACGATGGTATGAGCTGGT	110/143/0
9	PA1351	GGTCGAACTCAACCGCGC CCAGGTGGTAATCGGCCA	110/148/0
10	morA	CTCTACGAGACAGGCATCCC GCGACGTCACTCATCAGGAT	74/80

ве их геномов с помощью программ *Pseudomonas Analyser* и MLST typer.

Субкластер Аа представлен 6 генотипами, в которые входят штаммы с разных территорий Российской Федерации (Москва, Самара, Мариуполь, Хабаровск), выделенные с 2014 по 2023 г. Интересно отметить, что генотипы Аа5 и Аа6 включали в себя штаммы сиквенс-типа ST 395, выделенные в одно и то же время – в январе 2020 г., которые, в свою очередь, являются эпидемическими клонами «высокого риска», одинаковыми по серо- и ST-типу, но разными по INDEL-локусам [15].

Субкластеры Ab и Ас являются самыми крупными по числу включаемых генотипов. Субкластер Ab включает 10 генотипов, часть из которых представлена единичными уникальными штаммами: Ab1, Ab5, Ab9 (рис. 2). Штаммы, представленные этими генотипами, были выделены в Ростове-на-Дону в 2022 г., Мариуполе – в 2023 г., Владивостоке – в 2015 г. Интересно отметить и то, что штамм *P. aeruginosa* PAEM, выделенный во Владивостоке в 2015 г. из продуктов питания (мясо), имел уникальный INDEL-генотип (Ab9) и сиквенс-тип (2502), но при этом входил в общий субкластер со штаммами, выделенными от человека, что свидетельствует о широком распространении данной генетической линии.

Штаммы, имеющие генотип Ab4, выделялись в пределах довольно широкого промежутка времени (с 2016 по 2023 г.) и были представлены различными ST- и серотипами. Также стоит отметить и то, что среди этих штаммов были те, которые относились к сиквенс-типу ST 111 и считаются приуроченными к эпидемическим клоном «высокого риска» [16].

В противовес этому штаммы с генотипом Ab10 демонстрируют свою гомологию как по ST-типу (ST 155), так и по

INDEL-профилю, поскольку все представленные штаммы этого генотипа были получены от одного референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, что демонстрируют данные базы NCBI.

Субкластер Ас представлен в основном штаммами, выделенными в Москве в период с 2014 по 2020 г. Некоторые генотипы, такие как Ас6, Ас7, Ас13, включали штаммы из Ростова-на-Дону и Самары. Примечательно и то, что генотипы Ас2, Ас3, Ас5 включали штаммы с сиквенс-типом ST2592, который является эпидемически значимым [17]. В кластере Ас фигурировали уникальные единичные генотипы Ас8, Ас9, Ас10, Ас11, Ас12, которые были представлены штаммами, выделенными в Москве в 2017–2020 гг.

Интересно отметить, что в составе генотипов Ас9 и Ас11 штаммы имеют общий сиквенс-тип (ST233) и серотип (O6), но при этом данные штаммы не были объединены в единый генотип, имея гомологию по серо- и сиквенс-типу. Эти результаты свидетельствуют, что систему типирования по INDEL-локусам можно использовать как инструмент для определения генетического родства штаммов при отсутствии возможности проводить MLST- и серотипирование.

Небольшой кластер В образован штаммами, каждый из которых образует свой уникальный генотип (В1, В2, В3, В4): 2 штамма из Москвы (В1, В2), 1 из Самары (В3) и 1 из Московской области (В4). Интерес представляет штамм генотипа В1, выделенный в 2012 г. в Московской области. Данный штамм исследовался в работе R.Recio et al. (2020), имеет сиквенс-тип ST235, демонстрирующий высокий уровень лекарственной устойчивости и эпидемического распространения [18]. Остальные штаммы сиквенс-типа ST235,

выделенные в Москве, распределились между генотипами С1–С6.

Кластер С представлен преимущественно штаммами из Москвы, Самары и Нижнего Новгорода, выделенными с 2012 по 2020 г. и имеющими в основном сиквенс-тип ST235. Однако штаммы распределены по различным генотипам – от С1 до С6. Штаммы, выделенные в Москве (2012–2013 гг.), имеют генотипы С2 и С3, при общем сиквенс- и серотипе со штаммом из генотипа В1, но при этом штаммы генотипа В1 не вошли в кластеры С2 и С3. Данный факт показывает, что выбранный нами метод позволяет идентифицировать генетическую вариабельность микроорганизма внутри одного сиквенс- и серотипа.

Стоит отметить и несколько генотипов кластера D. Так, например, генотипы D1 и D2 включают штаммы синегнойной палочки, выделенные в Мариуполе в 2023 г., но при этом имеют общий серотип O1 со штаммом генотипа D3, выделенным в Самаре в 2020 г. Необходимо отметить, что генотип D9 также включает штамм, полученный в Мариуполе в 2023 г., и имеет общий сиквенс-тип со штаммом ST845, выделенным в Москве в 2020 г., однако другие штаммы данного генотипа отличаются как по сиквенс-типу, так и по месту и времени их выделения (Самара – 2020 г., Москва – 2017 и 2020 гг.). Аналогичную ситуацию можно отметить со штаммами генотипа D10: в него входит штамм, также выделенный в Мариуполе в 2023 г., который имеет сиквенс-тип ST685, как и штамм, изолированный в Самаре в 2020 г. Вместе с тем другой штамм, входящий в генотип D10, также выделенный в 2020 г. в Самаре, характеризуется другим сиквенс-типом (ST3768). При этом все эти штаммы имеют идентичные полиморфные варианты INDEL-локусов, что демонстрирует их генетическое родство.

Кластер E был в основном представлен штаммами с сиквенс-типом ST654. Отметим также, что большое количество штаммов в этом кластере было выделено в Москве в 2017–2020 гг. Интересно и то, что данные штаммы были серотипированы М.Тюментсева et al. (2021) и принадлежали к серотипу O4, но встречались представители серогруппы O11 [19]. Также было установлено, что другие штаммы, выделенные в Нижнем Новгороде в 2018 г. и в Хабаровске в 2022 г., были типированы и отнесены к серогруппе O4 с помощью программы *Pseudomonas Analyser*. Генотипы E1, E2, E3, E4 включали штаммы микроорганизмов, выделенные исключительно в Москве. Вместе с тем генотипы E4 и E5 содержали штамм, принадлежавший к серогруппе O11, кроме того, E5 генотип включал штаммы, выделенные в Нижнем Новгороде в 2018 г. и в Хабаровске в 2022 г. (рис. 2). Таким образом, с помощью системы INDEL-типирования удалось разделить на генотипы не только штаммы, принадлежащие к одному клональному комплексу, но и схожие серогруппы, что, в свою очередь, помогает совершенствовать системы поиска клонов среди клинических штаммов.

Таким образом, регистрируемые случаи заболеваний в лечебных учреждениях могут быть обусловлены как одним клоном, так и разными, но при этом не имеющими территориальных ассоциаций, что коррелирует с данными других авторов [20–23]. Поэтому для выяснения источника и путей распространения штамма из одного отделения в другое, от медицинского персонала или от ранее инфицированного

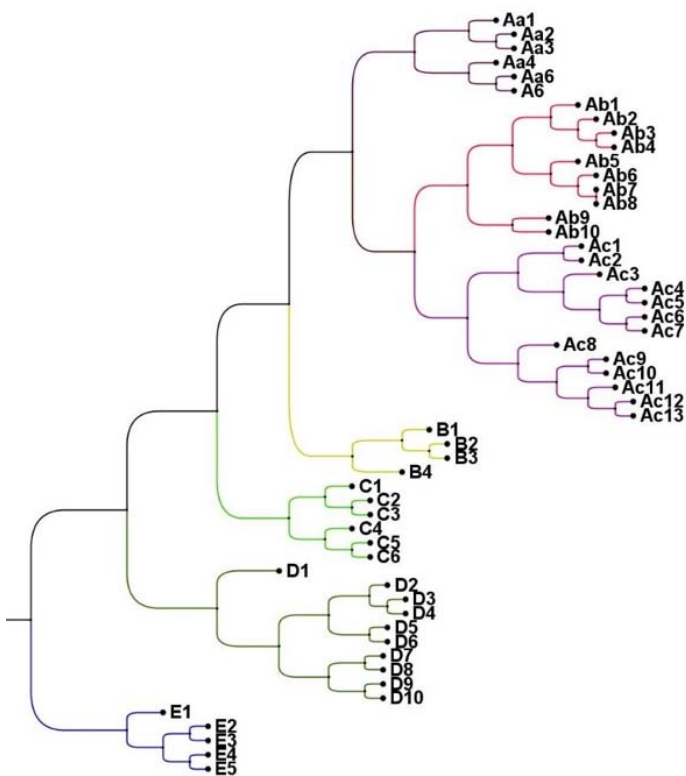


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая филогенетические связи между различными INDEL-генотипами *P. aeruginosa*.
Fig. 2. Dendrogram showing phylogenetic relationships between different INDEL genotypes of *P. aeruginosa*.

пациента необходимы методы идентификации возбудителя, которые могут выявлять его клональные связи.

В рамках настоящего исследования разработана система INDEL-типирования, включающая сконструированные праймеры к 10 INDEL-локусам, с помощью которых можно провести внутривидовую дифференциацию штаммов как *in vitro* (в ПЦР), так и *in silico* (на основе данных полногеномного секвенирования).

Данный метод хорошо сочетается с MLST- или серотипированием для комплексной оценки генетического профиля возбудителя инфекции, однако при отсутствии методик секвенирования оценивается как независимый метод генотипирования.

Использование данного варианта INDEL-типирования не требует внедрения особых лабораторных приемов при анализе большого количества данных с большой дискриминирующей способностью. Этот вопрос остается актуальным как раньше (2015 г.), так и сейчас, в связи с продлением экономических санкций в отношении Российской Федерации со стороны США, стран Евросоюза и ряда других стран. Импортозамещение становится одной из стратегических задач, поскольку в условиях, когда доступ к зарубежным технологиям, а также иностранным банкам данных затруднен, России необходимо замещать зарубежные технологии отечественными разработками [24].

Заключение

На основе сравнительного анализа геномов возбудителя синегнойной инфекции разработан новый метод внутривидовой дифференциации с помощью INDEL-маркеров. Показано, что INDEL-типирование *P. aeruginosa* является полезным инструментом, позволяющим выявлять особенности распределения отдельных генотипов изучаемого микроорганизма.

Разработанная схема INDEL-типирования может как выступать самостоятельным методом типирования, так и дополнять другие методы, такие как серотипирование и MLST-анализ. В последнем случае INDEL-типирование повышает дискриминирующую силу проводимого анализа.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о циркуляции различных INDEL-генотипов штаммов *P. aeruginosa* на территории Российской Федерации в течение длительного времени.

Источник финансирования

Полногеномное секвенирование проведено в рамках федеральной программы «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Funding source

Genome-wide sequencing was carried out within the framework of the federal program “Sanitary shield – health safety (prevention, detection, response)”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Babenko D, Turmuhambetova A, Sandle T, Pestrea SA, Moraru D, Cheșcă A. In silico comparison of different types of MLVA with PFGE based on *Pseudomonas aeruginosa* genomes. *Acta Medica*. 2017;33:347.
2. Shiralizadeh S, Keramat F, Hashemi SH, Majzoobi MM, Azimzadeh M, Alikhani MS, et al. Investigation of antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among Coronavirus disease-19 patients. *BMC Microbiol*. 2023 Mar 29;23(1):84. DOI: 10.1186/s12866-023-02825-w
3. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020 Aug;81(2):266-275. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046
4. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology*. 2015;7(2):44.
5. Гончарова ЮО, Бахтеева ИВ, Миронова РИ, Богун АГ, Хлопова КВ, Тимофеев ВС. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных на территории России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;1:95-102. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102
6. Эйдельштейн МВ, Шек ЕА, Сухорукова МВ, Склеенова ЕЮ, Иванчик НВ, Шайдуллина ЭР, и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):160-170. DOI: 10.36488/смас.2019.2.160-170
7. Водопьянов АС, Водопьянов СО, Олейников ИП, Мишанькин БН. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017;22(4):195-200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200
8. Sorokin VM, Vodopyanov AS, Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(2):193-202.
9. Kizil S, Basak M, Guden B, Tosun HS, Uzun B, Yol E. Genome-Wide Discovery of InDel Markers in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Using ddRADSeq. *Plants (Basel)*. 2020 Sep 24;9(10):1262. DOI: 10.3390/plants9101262
10. Jin R, Cui W, Fang Y, Jin X, Wang H, Lan Q, et al. A Novel Panel of 43 Insertion/Deletion Loci for Human Identifications of Forensic Degraded DNA Samples: Development and Validation. *Front Genet*. 2021 Mar 11;12:610540. DOI: 10.3389/fgene.2021.610540
11. Chung JC, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, et al. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. *J Bacteriol*. 2012 Sep;194(18):4857-66. DOI: 10.1128/JB.01050-12
12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011 Oct;28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
13. Ковалевич АА, Водопьянов АС, Писанов РВ. Программа для ЭВМ «Pseudomonas Analyser – программа для анализа данных полногеномного секвенирования возбудителя синегнойной инфекции». Свидетельство о государственной регистрации №2023667063 от 09.08.2023.
14. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора: [сайт]. 26.06.2023. Режим доступа: <http://antiplague.ru/mlst-typer> (дата обращения: 21.11.2023). Текст: электронный.
15. Virieux-Petit M, Hammer-Dedet F, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success. *Genes (Basel)*. 2022 Feb 4;13(2):301. DOI: 10.3390/genes13020301
16. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Mar;24(3):258-266. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.06.018

17. Савинова ТА, Лазарева АВ, Шамина ОВ, Крыжановская ОА, Чеботарь ИВ, Маянский НА. Генотипы и носительство металло-бета-лактамаз среди карбапенеморезистентных *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у детей в г. Москве. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018;20(4):370-374.
18. Recio R, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, et al. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Apr;39(4):671-678. DOI: 10.1007/s10096-019-03780-z
19. Tyumentseva M, Mikhaylova Y, Prelovskaya A, Karbyshev K, Tyumentsev A, Petrova L, et al. CRISPR Element Patterns vs. Pathoadaptability of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Medical Center in Moscow, Russia. Antibiotics (Basel). 2021 Oct 26;10(11):1301. DOI: 10.3390/antibiotics10111301
20. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, et al. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. BMC Infect Dis. 2011 Oct 13;11:272. DOI: 10.1186/1471-2334-11-272
21. Angeletti S, Cella E, Prosperi M, Spoto S, Fogolari M, De Florio L, et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. Microb Pathog. 2018 Oct;123:233-241. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.020
22. Аветисян ЛР, Шагинян ИА, Чернуха МЮ, Бурмистров ЕМ, Медведева ОС, Русакова ЕВ, и др. Эпидемиологический надзор за хроническими инфекциями легких, вызванными бактериями *Burkholderia cepacia* complex, бактериями рода *Achromobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* и метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus*, у больных муковисцидозом. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2020;19(1):14-23. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-14-23
23. Pulusu CP, Manivannan B, Raman SS, Singh S, Khamari B, Lama M, et al. Localized outbreaks of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to international high-risk clones in a south Indian hospital. J Med Microbiol. 2022 Mar;71(3). DOI: 10.1099/jmm.0.001500
24. Дятлов ИА, Миронов АЮ, Шепелин АП, Алешкин ВА. Состояние и тенденция развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(80):61-5.
- and Antimicrobial Chemotherapy. 2019;21(2):160-170. DOI: 10.36488/смач.2019.2.160-170 (In Russian).
7. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Oleinikov IP, Mishankin BN. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. Epidemiology and Infectious Diseases. 2017;22(4):195-200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200 (In Russian).
8. Sorokin VM, Vodopyanov AS, Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2022;99(2):193-202.
9. Kizil S, Basak M, Guden B, Tosun HS, Uzun B, Yol E. Genome-Wide Discovery of InDel Markers in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Using ddRADSeq. Plants (Basel). 2020 Sep 24;9(10):1262. DOI: 10.3390/plants9101262
10. Jin R, Cui W, Fang Y, Jin X, Wang H, Lan Q, et al. A Novel Panel of 43 Insertion/Deletion Loci for Human Identifications of Forensic Degraded DNA Samples: Development and Validation. Front Genet. 2021 Mar 11;12:610540. DOI: 10.3389/fgene.2021.610540
11. Chung JC, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, et al. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. J Bacteriol. 2012 Sep;194(18):4857-66. DOI: 10.1128/JB.01050-12
12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
13. Kovalevich AA, Vodopyanov AS, Pisanov RV. Computer program "Pseudomonas Analyser – a program for analyzing the data of whole – genome sequencing of the causative agent of pseudomonas infection". Certificate of state registration No 2023667063 dated 08/09/2023. (In Russian).
14. Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute Rospotrebnadzor: [website]. 26.06.2023. Available at: <http://antiplague.ru/mlst-typer> (accessed: 21.11.2023). Text: electronic. (In Russian).
15. Virieux-Petit M, Hammer-Dedet F, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success. Genes (Basel). 2022 Feb 4;13(2):301. DOI: 10.3390/genes13020301
16. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect. 2018 Mar;24(3):258-266. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.06.018
17. Savinova TA, Lazareva AV, Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Chebotar IV, Mayanskiy NA. Genotypes and metallo-beta-lactamases carriage in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children in Moscow. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2018;20(4):370-374. (In Russian).
18. Recio R, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, et al. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Apr;39(4):671-678. DOI: 10.1007/s10096-019-03780-z
19. Tyumentseva M, Mikhaylova Y, Prelovskaya A, Karbyshev K, Tyumentsev A, Petrova L, et al. CRISPR Element Patterns vs. Pathoadaptability of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Medical Center in Moscow, Russia. Antibiotics (Basel). 2021 Oct 26;10(11):1301. DOI: 10.3390/antibiotics10111301
20. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, et al. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. BMC Infect Dis. 2011 Oct 13;11:272. DOI: 10.1186/1471-2334-11-272
21. Angeletti S, Cella E, Prosperi M, Spoto S, Fogolari M, De Florio L, et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. Microb Pathog. 2018 Oct;123:233-241. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.020
22. Avetisyan LR, Shaginyan IA, Chernukha MYu, Burmistrov EM, Medvedeva OS, Rusakova EV, et al. Directions of epidemiological surveillance of chronic lung

References

1. Babenko D, Turmuhambetova A, Sandle T, Pestrea SA, Moraru D, Cheșcă A. In silico comparison of different types of MLVA with PFGE based on *Pseudomonas aeruginosa* genomes. Acta Medica. 2017;33:347.
2. Shiralizadeh S, Keramat F, Hashemi SH, Majzoobi MM, Azimzadeh M, Alikhani MS, et al. Investigation of antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among Coronavirus disease-19 patients. BMC Microbiol. 2023 Mar 29;23(1):84. DOI: 10.1186/s12866-023-02825-w
3. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Infect. 2020 Aug;81(2):266-275. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046
4. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – pathogenesis and pathogenic mechanisms. International Journal of Biology. 2015;7(2):44.
5. Goncharova YuO, Bakhteeva IV, Mironova RI, Bogun AG, Khlopova KV, Timofeev VS. Multilocus Sequence-Typing of Anthrax Microbe Strains Isolated in Russia and Neighboring Countries. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2021;1:95-102. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102 (In Russian).
6. Edelstein MV, Shek EA, Sukhorukova MV, Skleenova EYu, Ivanchik NV, Shajdullina ER, et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "Marathon 2015–2016". Clinical Microbiology

infections caused by *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(1):14-23. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-14-23 (In Russian).

23. Pulusu CP, Manivannan B, Raman SS, Singh S, Khamari B, Lama M, et al. Localized outbreaks of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to international high-risk clones in a south Indian hospital. *J Med Microbiol*. 2022 Mar;71(3). DOI: 10.1099/jmm.0.001500
24. Dyatlov IA, Mironov AYU, Shepelin AP, Aleshkin VA. The condition and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and problem of import substitution. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015;60(80):61-5. (In Russian).

Информация о соавторах:

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Alexey S. Vodopyanov, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Svetlana U. Temyakova, Junior Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Бактерии ротовой полости человека размножаются посредством редкой формы деления клеток

Форма бактериальных клеток и способ, которым бактерии поддерживают свою форму посредством клеточного размножения, являются фундаментальными биологическими характеристиками, которые связывают форму, физиологию и окружающую среду в микробном мире. В то время как большинство бактерий делятся бинарным делением, обнаружен замечательный пример одновременного множественного деления у нитчатой бактерии, которая играет ключевую структурную роль в человеческом зубном налете. Это исследование расширяет понимание микробиома полости рта, где сотни видов бактерий конкурируют за пространство и питательные вещества, образуя биопленки, которые оказывают прямое влияние на здоровье человека. И эти выводы выходят за рамки микробиома полости рта, раскрывая уникальный цикл бактериальных клеток и пример того, как морфология клеток и репродуктивная стратегия могут влиять на пространственную организацию микробных сообществ.

Организмы демонстрируют огромное разнообразие форм, размеров и репродуктивных стратегий. В микроскопических масштабах морфология бактериальных клеток и динамика роста являются адаптивными чертами, которые влияют на пространственную организацию микробных сообществ. В одном из таких сообществ – биопленке зубного налета человека – сеть нитевидных клеток *Corynebacterium matruchotii* образует ядро бактериальных консорциумов, известных как ежи, но процессы, которые генерируют эти структуры, неясны. Используя покадровую микроскопию живых клеток и флуоресцентные D-аминокислоты для отслеживания биосинтеза пептидогликана, сообщается о необычном примере одновременного множественного деления в домене Бактерии. Показано, что клетки *C. matruchotii* удлиняются на одном полюсе за счет удлинения кончика, аналогично стратегии роста бактерий *Streptomyces*, обитающих в почве. Нити удлиняются быстро, со скоростью, более чем в пять раз превышающей скорость других близкородственных видов бактерий. После удлинения одновременно формируется множество перегородок, и каждая клетка делится на 3–14 дочерних клеток в зависимости от длины материнской нити. Затем дочерние клетки зарождают отростки новых более тонких вегетативных нитей, создавая классическую морфологию «ручки хлыста» этого таксона. Эти результаты расширяют известное разнообразие бактериальных клеточных циклов и помогают объяснить, как эта нитчатая бактерия может конкурировать за пространство, получать доступ к питательным веществам и формировать важные межвидовые взаимодействия в зубном налете.



Chimileski S, Borisy GG, Dewhirst FE, Mark Welch JL.

Tip extension and simultaneous multiple fission in a filamentous bacterium.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2024 Sep 10;121(37):e2408654121. DOI: 10.1073/pnas.2408654121

Идентификация ботулинического токсина типа А методом масс-спектрометрии в сочетании с иммуномагнитной сепарацией

А.К.Сурин^{1,2}, Н.А.Петухов¹, М.А.Шкуратова¹, А.Е.Хлынцева¹, М.М.Рогозин¹,
Я.О.Романенко¹, В.В.Фирстова^{1,2}

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

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, Российская Федерация

Ботулинические нейротоксины продуцируются анаэробными бактериями рода *Clostridium* и вызывают стойкий паралич периферических нервных окончаний, который известен как ботулизм. Данное заболевание требует своевременной диагностики и выявления источников заражения для предотвращения вспышек. При этом традиционные методы обнаружения токсина имеют значительные недостатки: полимеразная цепная реакция и микробиологическое исследование не всегда обеспечивают необходимую скорость и точность. В данном исследовании проводилась оценка эффективности метода детекции ботулотоксина типа А в сложных биологических жидкостях с использованием масс-спектрометрического анализа с иммуномагнитной сепарацией. В ходе работы было получено четыре варианта композиционных магнимоносорбентов для детекции ботулотоксина типа А. В качестве экспериментальной модели использовали консервированные соленья с добавлением рекомбинантных белков ботулотоксина типа А. Полученные композиционные магнимоносорбенты использовали для концентрирования целевого белка из образца для возможности идентификации токсина методом тандемной масс-спектрометрии. Наибольшую результативность продемонстрировали композиционные магнимоносорбенты, содержащие моноклональные антитела tab_CB-HCA_1-8 к тяжелой цепи ботулотоксина типа А. Эффективность детекции ботулотоксина оценивалась по количеству идентифицированных пептидов в результате масс-спектрометрического анализа. Предложен композиционный магнитный иммуносорбент на основе моноклональных антител, позволяющий определять с высокой чувствительностью (до 500 нг/мл) и специфичностью наличие ботулинического нейротоксина в сложных биологических жидкостях.

Ключевые слова: ботулинический нейротоксин, композиционные магнимоносорбенты, моноклональные антитела, масс-спектрометрия

Для цитирования: Сурин А.К., Петухов Н.А., Шкуратова М.А., Хлынцева А.Е., Рогозин М.М., Романенко Я.О., Фирстова В.В. Идентификация ботулинического токсина типа А методом масс-спектрометрии в сочетании с иммуномагнитной сепарацией. Бактериология. 2024; 9(4): 82–87. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-82-87

Identification of botulinum toxin type A by mass spectrometry combined with immunomagnetic separation

А.К.Surin^{1,2}, N.A.Petukhov¹, M.A.Shkuratova¹, A.E.Khlyntseva¹, M.M.Rogozin¹, Ya.O.Romanenko¹, V.V.Firstova^{1,2}

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation;

²Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Botulinum neurotoxins are producing by anaerobic bacteria of the genus *Clostridium* and cause persistent paralysis of peripheral nerve endings, known as botulism. This disease requires timely diagnosis and identification of sources of infection to prevent outbreaks. However, traditional methods of detecting the toxin have significant drawbacks: PCR and microbiological testing do not always provide the necessary speed and accuracy. This study assessed the effectiveness of the method for detecting botulinum toxin type A in complex biological fluids using mass spectrometric analysis with immunomagnetic separation. In the course of the work, four variants of composite magnetic immunosorbents for the detection of botulinum toxin type A were obtained. Canned pickles with the addition of recombinant proteins of botulinum toxin type A were used as an experimental model. The obtained composite magnoimmunossorbents were used to concentrate the target protein from the sample to enable

Для корреспонденции:

Петухов Никита Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии 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) 36-00-03

Статья поступила 01.11.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Nikita A. Petukhov, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-03

The article was received 01.11.2024, accepted for publication 25.12.2024

the identification of the toxin by tandem mass spectrometry. The highest efficiency was demonstrated by composite magnoimmunosorbents containing monoclonal antibodies mab_CB-HCA_1-8 to the heavy chain of botulinum toxin type A. The efficiency of botulinum toxin detection was assessed by the number of identified peptides, as a result of mass spectrometric analysis. A composite magnetic immunosorbent based on monoclonal antibodies is proposed, which allows determining the presence of botulinum neurotoxin in complex biological fluids with high sensitivity (up to 500 ng/ml) and specificity.

Key words: botulinum neurotoxin, composite magnetic immunosorbents, monoclonal antibodies, mass spectrometry

For citation: Surin A.K., Petukhov N.A., Shkuratova M.A., Khlyntseva A.E., Rogozin M.M., Romanenko Ya.O., Firstova V.V. Identification of botulinum toxin type A by mass spectrometry combined with immunomagnetic separation. *Bacteriology*. 2024; 9(4): 82–87. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-82-87

Пищевой ботулизм – это форма интоксикации человека, развивающаяся в результате попадания в организм человека ботулинических нейротоксинов (BoNTs). Источником BoNT является *Clostridium botulinum* – анаэробная грамположительная бактерия. Заболевания человека вызывают BoNTs типов А, В, реже Е и F [1]. В организме человека *C. botulinum* размножаются слабо и не синтезируют токсины, за редким исключением. Ботулотоксин накапливается в пищевых продуктах, инфицированных спорами *C. botulinum*, при их прорастании, если созданы анаэробные условия (например, при консервировании). Летальность от пищевого ботулизма в развитых странах составляет 5–10% [2].

Обнаружение BoNT в биологических образцах и продуктах питания имеет решающее значение для ранней диагностики ботулизма и своевременного эффективного лечения заболевания. Кроме того, своевременное выявление источника заражения играет важную роль для предотвращения вспышки ботулизма [3].

Золотым стандартом для обнаружения и идентификации BoNTs является биологический анализ токсичности образца и нейтрализации его сыворотками против ботулинических нейротоксинов разных типов на модели мышей. Однако этот метод имеет несколько недостатков, включая трудоемкость, неэффективность затрат, использование животных и длительность исследования (>4 дней).

Дополнительными методами идентификации наличия и типа токсина в биологических матрицах являются методы иммуноферментного анализа (ИФА) и масс-спектрометрии (МС). Метод ИФА является наиболее чувствительным на сегодняшний момент. Однако при высокой чувствительности этого метода его точность может варьировать от 75 до 95%, что определяется свойствами моноклонального антитела (МКА), сложностью состава биологического образца, а также особенностями подготовки образца для анализа. Метод МС, являясь менее чувствительным по сравнению с ИФА, обладает существенно большей степенью достоверности, которая варьирует от 90 до 100%. Кроме того, метод МС позволяет работать со сложными смесями, что делает его идеальным инструментом для обнаружения и характеристики пищевых токсинов. Предварительное концентрирование токсина с использованием магноиммуносорбентов позволяет обнаруживать BoNT в образцах методом МС при низких концентрациях (нг/мл).

Цель исследования – идентифицировать ботулотоксин типа А в сложной биологической жидкости методом масс-спектрометрии в сочетании с иммуномагнитной сепарацией.

Материалы и методы

Приготовление композиционных магноиммуносорбентов

В работе использовали магнитные сорбенты, приготовленные из оксида железа. Данные магносорбенты были получены из ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

Для приготовления композиционных магноиммуносорбентов (КМИС), необходимых для детекции BoNT, были выбраны МКА mab_CB-HCA_1-8 и mab_CB-HCA_2-11 против тяжелой цепи (HC) BoNT А, а также mab_CB-LCA_1-9 против легкой цепи (LC) BoNT А. Указанные МКА и рекомбинантные белки были получены в лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора [4–6].

Для получения КМИС во флаконы пенициллиновые ФО-1-10-НС-1 насыпали навеску магносорбентов. Связывание МКА с магнитными частицами проводили двумя способами: физической сорбцией и ковалентной сшивкой. За основу использовали методику, описанную в патенте, с изменениями и дополнениями [7].

Приготовление КМИС с физической сорбцией. Для получения аффинных свойств КМИС первоначально проводили активирование: на каждые 0,1 г магносорбентов вносили по 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) («Эко-Сервис», Россия), pH 7,2, и 0,05 мл поверхностно активного вещества (ПАВ) – вторичного алкилсульфата натрия, инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Далее вносили МКА в различных концентрациях (табл. 1), инкубировали 2 ч при температуре 24°C, трижды отмывали в ФСБ от несвязавшихся МКА и использовали в работе.

Получение КМИС с ковалентной сшивкой. Для получения аффинных свойств КМИС первоначально проводили активирование: на каждые 0,1 г МС вносили по 3 мл 0,2%-го рас-

Таблица 1. Моноклональные антитела, используемые для приготовления КМИС

Table 1. Monoclonal antibodies used for the preparation of CMIS

№ п/п	МКА / MCA	Вносимый объем, мл / Volume introduced, ml	Концентрация белка, мг/мл / Protein concentration, mg/ml	Общая масса белка, мг / Total protein mass, mg
1	mab_CB-LCA_1-9 против rLC BoNT A	0,5	1,6	0,8
2	mab_CB-HCA_2-11 против rHC BoNT A	1	2,1	2,1
3	mab_CBHCA_1-8 против rHC BoNT A	1	2,5	2,5

творя натрия перйодата (Acros Organics, Бельгия) на ФСБ рН 7,2, инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Далее добавляли МКА (согласно табл. 1), инкубировали 2 ч при температуре 24°C, трижды отмывали ФСБ от несвязавшихся белков и использовали в работе.

Таким образом были приготовлены следующие композиционные магноиммосорбенты для детекции ботулотоксина:

- традиционные с физической сорбцией, несущие мышинное МКА mab_CB-HCA_2-11 против HC/A BoNT;
- традиционные с ковалентной сшивкой, несущие мышинное МКА mab_CB-HCA_2-11 против HC/A BoNT;
- традиционные с физической сорбцией, несущие мышинное МКА mab_CB-HCA_1-8 против HC/A BoNT;
- традиционные с физической сорбцией, несущие мышинные МКА mab_CB-LCA_1-9 против LC/A BoNT.

Приготовление сложной биологической смеси

В качестве модели для определения концентрации BoNT использовали 50 мл консервированных солений, к которым добавляли 25 мкг рекомбинантного ботулотоксина типа А (rBoNT A). В анализируемом образце рН доводили до 7,5 гидроксидом калия (KOH). При увеличении рН образовывался осадок. Для удаления осадка и крупных частиц образец центрифугировали при 10 000 g 10 мин и фильтровали через мембрану с размером пор 0,45 µm (Millipore, Ирландия).

Элюция целевых белков с поверхности КМИС

Для элюции тяжелой и легкой цепей ботулинического нейротоксина типа А с КМИС использовали методику, описанную в патенте, с изменениями и дополнениями [7]. Десорбцию белка проводили 0,15%-м раствором KOH (ГОСТ 9285-78), который считается наиболее активным элюентом, обеспечивающим эффективную десорбцию токсина с магнитной иммобилизованной матрицы.

Постановку эксперимента осуществляли в микропробирках (1,5 мл) типа Эппендорф (Eppendorf, Австрия) с использованием магнитного сепаратора MagnaRacK (Invitrogen, США). К 100 мкл КМИС вносили по 0,1 мл белковых токсинов с концентрацией 500 мкг/мл. В контрольный образец вносили бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 60 мин при температуре 37°C и промывали 3 раза от несвязавшихся лигандов ФСБ с твин-20 (Sigma-Aldrich, США). Далее в осадок (0,025 г) вносили 100 мкл 0,15%-го раствора KOH на 20–30 мин. Супернатант, содержащий целевой белок, переносили в чистую пробирку и добавляли к нему 0,016 мл 0,1 М соляной кислоты (HCl, качество реактива – чистый для анализа, ГОСТ 3118 77) для нейтрализации щелочи.

Подготовка образцов к проведению масс-спектрометрического анализа

Для выделения рекомбинантного белка применяли метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле по Лэммли. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание белков в гелях красителем кумасси синим (Coomassie Brilliant blue R-250). Полученные белки вырезали из геля и помещали в пробирки типа Эппендорф (1,5 мл). Для удаления додецилсульфата натрия использовали метанол (40%) и уксусную кислоту (5%). Для отмывки от красителя кумасси синего добавляли 50% ацетонитрила в 50 mM NH₄HCO₃ и инкубировали при температуре 56°C в течение 30 мин, повторяя этап до полной отмывки.

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей проводили с использованием 5 mM дихлор-дифенил-трихлорэтана (в течение 30 мин при температуре 25°C) и 15 mM йодацетамида (в течение 30 мин при температуре 25°C). Затем к гелю добавляли ацетонитрил (100%), после удаления которого происходило высушивание геля на вакуумном концентраторе miVac (Genevac, Великобритания). К полученным образцам добавляли раствор трипсина (0,01 мг/мл) в буфере 50 mM NH₄HCO₃ и инкубировали 20 ч при температуре 37°C, после чего реакция действия протеаз останавливалась 0,1% TFA (Trifluoroacetic acid) в 80%-м ацетонитриле в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации гель полностью высушивался в вакуумном концентраторе. Затем образцы растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1% TFA. Для удаления следов красителя, примеси солей и крупных пептидов проводилась очистка образцов на зип-типах. (Зип-тип – это наконечник, набитый стационарной фазой C18, которая выполняет роль фильтра.) Фаза C18 в наконечнике промывалась ацетонитрилом (сначала 90%-м, затем 4%-м) с добавлением 0,1% TFA. На подготовленный зип-тип наносился образец, который отмывали с фазы ацетонитрилом (сначала 4%-м, затем 90%-м) с добавлением 0,1% TFA. Полученный образец высушивали на вакуумном концентраторе. Далее хранение белков осуществлялось при температуре 4°C. Перед MS-анализом образец растворяли в 4%-м ацетонитриле с 0,1% TFA.

Масс-спектрометрический анализ

МС-анализ проводили на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения. Пептиды, полученные при гидролизе исследуемого белка, предварительно разделяли с помощью нанопотокового хроматографа Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), МС-анализ пептидов проводили на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Пептиды разделяли на капиллярной колонке диаметром 75 мкм и длиной 200 мм, набитой в лабораторных условиях частицами 3,6 мкм с порами 90 Å с привитой фазой C18. Образец элюировали в градиенте ацетонитрила в воде в присутствии 0,1% TFA. Изменение концентрации ацетонитрила с 4 до 50% проводили линейно в течении 120 мин. Смываемые с колонки пептиды ионизировали методом электрораспыления. Панорамные масс-спектры снимали в диапазоне от 300 до 1600 m/z. После каждого панорамного спектра снимали 10 спектров фрагментации для наиболее интенсивных ионов. Фрагментацию ионов проводили методом активации соударениями с молекулами инертного газа ДАС (диссоциация, активированная соударениями) в высокоэнергетической ячейке соударений.

Данные МС-анализа обрабатывали с помощью коммерческих программ PeaksStudio 7.5 и Xcalibur 2.2.

Результаты исследования и их обсуждение

Для магнитной сепарации ботулотоксина из анализируемых образцов были выбраны три МКА, специфичные к HC (mab_CB-HCA_2-11, mab_CB-HCA_1-8) и LC (mab_CB-LCA_1-9 МКА) BoNT типа А, полученных ранее в лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ.

С использованием mab_CB-HCA_2-11, mab_CB-HCA_1-8 и mab_CB-LCA_1-9 МКА были приготовлены традиционные

Таблица 2. КМИС, подготовленные для магнитной сепарации ботулотоксина
 Table 2. CMIS prepared for magnetic separation of botulinum toxin

№ п/п	Тип магносорбентов / Magnosorbent type	Тип связывания / Type of binding	МКА / MCA	Антиген / Antigen
1	Традиционные / Traditional	Ковалентная сшивка / Covalent crosslinking	mab_CB-HCA_2-11	HC BoNT тип А
2	Традиционные / Traditional	Физическая сорбция / Physical sorption	mab_CB-HCA_2-11	HC BoNT тип А
3	Традиционные / Traditional	Физическая сорбция / Physical sorption	mab_CB-HCA_1-8	HC BoNT тип А
4	Традиционные / Traditional	Физическая сорбция / Physical sorption	mab_CB-LCA_1-9	LC BoNT тип А

КМИС двумя методами: с физической сорбцией и с ковалентной сшивкой. В результате были получены четыре варианта КМИС для магнитной сепарации BoNT типа А (табл. 2).

Ковалентное связывание МКА с нерастворимым магнитным носителем осуществлялось через альдегидную группу с образованием азометиновой связи, что не оказывало влияния на специфическую активность антител. При физической сорбции использовали ПАВ для предотвращения агрегирования частиц и образования пространственных структур, сохраняющих специфическую активность МКА.

Сохранение специфической активности МКА, связанных с магносорбентом, подтверждали в ИФА (данные не приведены). Далее проводили магнитную сепарацию BoNT из консервированных продуктов с последующим МС-анализом (рис. 1). Для повышения качества выявления BoNT использовали метод tandemной МС, который основан на получении информации как о точной массе пептида, так и взаимном расположении аминокислот в пептиде. Об эффективности использования магнитных частиц с иммобилизованными МКА для детекции HC и LC BoNT судили по числу пептидов, идентифицированных в МС-анализе (табл. 3).

На основании данных МС-анализа было установлено, что наиболее эффективно концентрируют ботулотоксин типа А

Таблица 3. Эффективность использования магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами против HC и LC BoNT типа А для детекции ботулотоксина
 Table 3. Efficiency of using magnetic particles with immobilized monoclonal antibodies against HC and LC BoNT type A for detecting botulinum toxin

Тип AMP / AMP type	Концентрация ботулинического токсина* / Botulinum toxin concentration		
	25 мкг	50 мкг	100 мкг
2B11 к HC BoNT тип А (физическая сшивка / physical stitching)	–	НА	–
2B11 к HC BoNT тип А (ковалентная сшивка / covalent crosslinking)	–	НА	2
1F8 к HC BoNT тип А (физическая сшивка / physical stitching)	2	8	11
1F9/ к LC BoNT тип А (физическая сшивка / physical stitching)	М	19	М

*Цифрами указано число пептидов, идентифицированных в масс-спектрометрическом анализе трипсиновых фрагментов продуктов смыва с антител (AMP). / *The numbers indicate the number of peptides identified in the mass spectrometric analysis of trypsin fragments of antibody wash products (AMP).

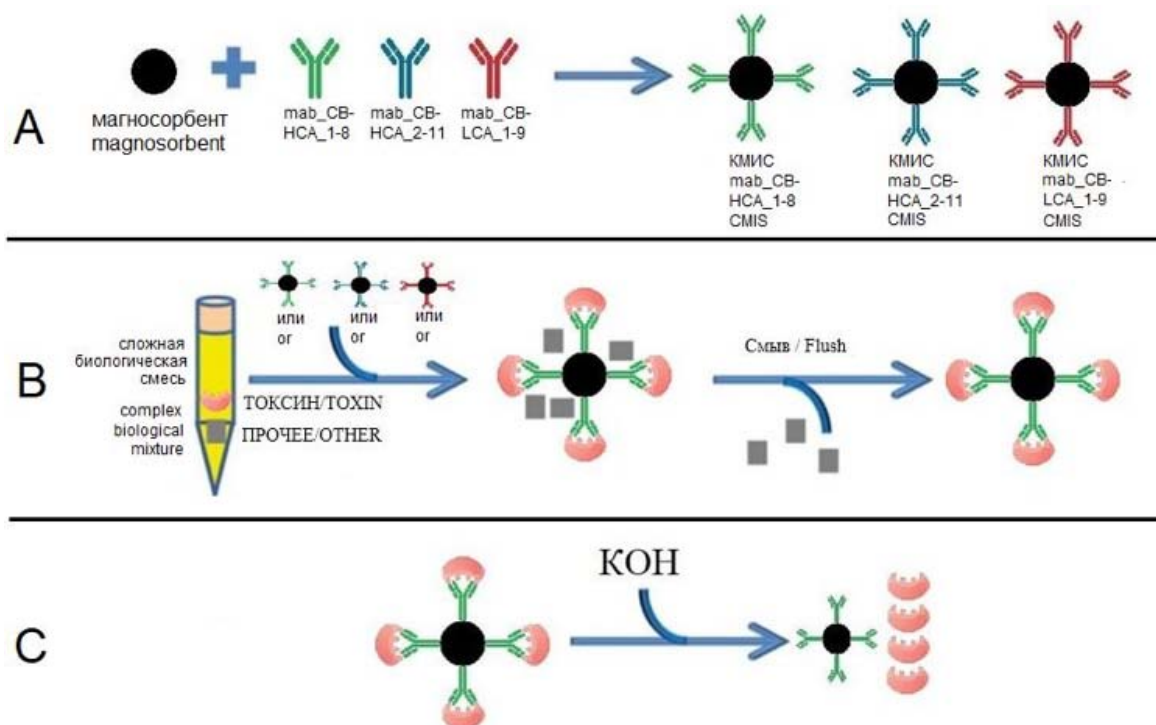


Рис. 1. Этапы магнитной сепарации ботулотоксина типа А из анализируемых образцов. А – приготовление КМИС, В – инкубация образца с КМИС, С – элюция ботулотоксина с КМИС.

Fig. 1. Stages of magnetic separation of botulinum toxin type A from analyzed samples. A – preparation of CMIS, B – incubation of sample with CMIS, C – elution of botulinum toxin from CMIS.

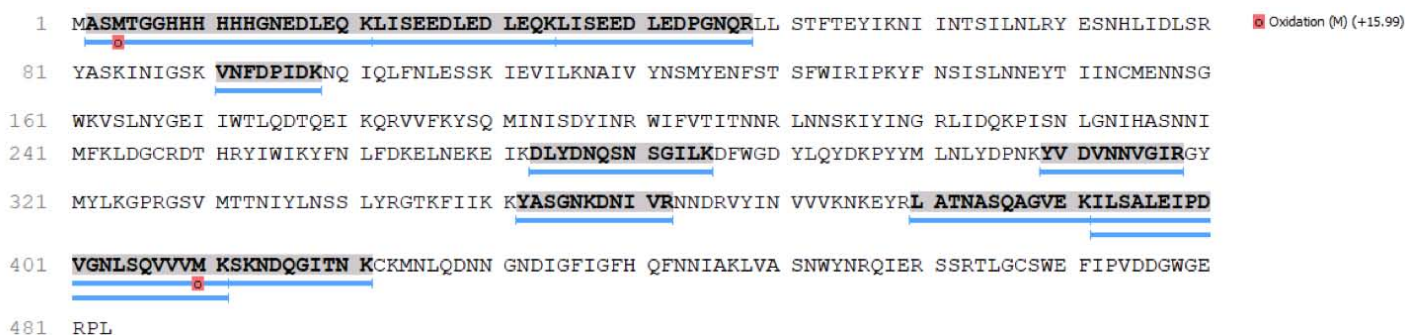


Рис. 2. Результат обработки программой Peaks Studio 7.5 масс-спектрометрических данных. Наложения идентифицированных пептидов на аминокислотную последовательность ботулотоксина типа А – темным фоном выделены участки аминокислотной последовательности, определенные методом масс-спектрометрии, синим цветом подчеркнуты последовательности, соответствующие найденным пептидам.

Fig. 2. Result of mass spectrometric data processing by Peaks Studio 7.5. Overlays of identified peptides on the amino acid sequence of botulinum toxin type A – dark background indicates sections of the amino acid sequence determined by mass spectrometry, sequences corresponding to the identified peptides are underlined in blue.

из образца сложной биологической смеси традиционные КМИС с физической сшивкой, несущие МКА mab_СВ-НСА_1-8 к НС ВоNT типа А. Идентифицированные пептиды аминокислотной последовательности ботулотоксина типа А представлены на рис. 2.

В результате МС-анализа были выявлены чаще всего детектируемые пептиды ботулинического токсина (НС ВоNT типа А) (табл. 4).

Диагностика ботулизма основывается в первую очередь на клинической картине, за которой следуют подтверждающие лабораторные анализы. Традиционными лабораторными процедурами являются полимеразная цепная реакция (ПЦР), микробиологическое исследование для обнаружения бактерий и биопроба на мышцах для обнаружения токсина. Тестирование ПЦР является быстрым, но для выполнения двух других процедур требуется несколько дней. Однако ПЦР обнаруживает гены *C. botulinum*, а не его токсин, и поэтому не является достаточным для подтверждения клинического диагноза ботулизма. При отсутствии быстрого, чув-

ствительного лабораторного теста для обнаружения ботулинического токсина врач должен принять решение об эмпирическом лечении антитоксином без поддержки лабораторных результатов. Наблюдаемые паралитические симптомы не являются специфичными для ботулизма, но также могут быть связаны с рядом других заболеваний. Неправильная диагностика ботулизма может привести к длительной госпитализации и зависимости от поддерживающей вентиляции легких, а при ошибочном подозрении на ботулизм пациентам могут ввести ненужный антитоксин, что несет риск анафилактики и сывороточной болезни.

Сконструированный нами КМИС на основе mab_СВ-НСА_1-8 позволил сконцентрировать целевой белок из 50 мл анализируемого образца. В данном исследовании чувствительность МС-анализа составила 500 нг/мл.

Заключение

Таким образом, в ходе работы нами был получен композиционный магнитоиммосорбент с физической сшивкой с МКА СВ-НСА_1-8, специфичный к ботулотоксину типа А, который позволил увеличить специфичность и чувствительность МС-анализа более чем на порядок.

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 1.1.14 в рамках государственного задания.

Funding information

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.14 within the framework of the state assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins (Basel). 2017 Jan 18;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038

Таблица 4. Пептиды ботулинического токсина, идентифицированные масс-спектрометрическим анализом
Table 4. Botulinum toxin peptides identified by mass spectrometric analysis

№	Аминокислотная последовательность идентифицированного пептида / Amino acid sequence of the identified peptide	Масса пептида / Peptide mass	m/z	z
1	K.ILSALEIPDVGNLSQVVVM(+15.99)K.S	2140,1814	714,4001	3
2	K.LISEEDLEDPGNQR.L	1613,7533	807,8822	2
3	.DLYDNQSN SGILK.D	1465,7048	733,8578	2
4	K.LISEEDLEDLEQK.L	1559,7566	780,8821	2
5	R.LATNASQAGVEK.I	1187,6146	594,8131	2
6	K.YASGNKDNI VR.N	1235,6259	618,8190	2
7	K.ILSALEIPDVGNLSQVVVMK.S	2124,1863	1063,0974	2
8	K.YDVNVNGIR.G	1147,5985	574,8056	2
9	K.VNFDPIDK.N	946,4760	474,2453	2
10	M.ASM(+15.99) TGGHHHHHHHGNEDLEQK.L	2273,9734	569,4994	4
11	K.SKNDQGITNK.C	1103,5571	552,7855	2

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Botulism Annual Summary, 2018. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2021.
- Никифоров ВВ, Томилин ЮН, Чернобровкина ТЯ, Янковская ЯД, Бузова СВ. Трудности ранней диагностики и лечения ботулизма. Архив внутренней медицины. 2019;9(4):253-259. DOI: 10.20514/2226-6704-2019-9-4-253-259
- Рябко АК, Козырь АВ, Колесников АВ, Хлынцова АЕ, Жарникова ИВ, Шемякин ИГ. Стратегии повышения чувствительности детекции аналитов в иммуно-ПЦР, изученные на примере выявления нейротоксина ботулизма типа А. Прикладная биохимия и микробиология. 2016;52(1):128. DOI: 10.7868/S0555109916010116
- Zeninskaya NA, Ryabko AK, Marin MA, Kombarova TI, Shkuratova MA, Rogozin MM, et al. Selection of Candidate Monoclonal Antibodies for Therapy of Botulinum Toxin Type A Intoxications. *Toxins (Basel)*. 2024 Jun 21;16(7):284. DOI: 10.3390/toxins16070284
- Зенинская НА, Марьян МА, Рябко АК, Карцева АС, Силкина МВ, Комбарова ТИ, и др. Получение гибридом, синтезирующих мышинные моноклональные антитела против легкой цепи ботулотоксина типа А. Бактериология. 2022;7(3):33.
- Geogdjayan AS, Zharnikova IV, Kurcheva SA, Koteneva EA, Zharnikova TV, Gnusareva OA, et al. Patent for invention No 2756202 from 28.09.2021. Bul. No 28. Method of obtaining magnetic immunosorbents for selective concentration of *F. tularensis* from environmental objects with subsequent detection by MALDI-TOF MS/ MS/. *Tularensis* from environmental objects with subsequent detection by MALDI-TOF MS method.
- Geogdjayan AS, Zharnikova IV, Kurcheva SA, Koteneva EA, Zharnikova TV, Gnusareva OA, et al. Patent for invention No 2756202 from 28.09.2021. Bul. No 28. Method of obtaining magnetic immunosorbents for selective concentration of *F. tularensis* from environmental objects with subsequent detection by MALDI-TOF MS/ MS/. *Tularensis* from environmental objects with subsequent detection by MALDI-TOF MS method.

References

- Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins (Basel)*. 2017 Jan 18;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Botulism Annual Summary, 2018. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2021.
- Nikiforov VV, Tomilin YuN, Chernobrovkina TYa, Yankovskaya YaD, Burova SV. The difficulties of early diagnosis and treatment of botulism. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2019;9(4):253-259. DOI: 10.20514/2226-6704-2019-9-4-253-259 (In Russian).
- Ryabko AK, Kozyr' AV, Kolesnikov AV, Khlyntseva AE, Shemyakin IG, Zharnikova IV. Strategies for upgrading analyte detection in immuno-PCR studied on identification of type A botulinum neurotoxin. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016;52(1):128. DOI: 10.7868/S0555109916010116 (In Russian).
- Zeninskaya NA, Ryabko AK, Marin MA, Kombarova TI, Shkuratova MA, Rogozin MM, et al. Selection of Candidate Monoclonal Antibodies for Therapy of Botulinum Toxin Type A Intoxications. *Toxins (Basel)*. 2024 Jun 21;16(7):284. DOI: 10.3390/toxins16070284
- Zeninskaya NA, Maryin MA, Ryabko AK, Kartseva AS, Silkina MV, Kombarova TI, et al. Obtaining hybridomas that synthesise mouse monoclonal antibodies against the light chain of botulinum toxin type A. *Bacteriology*. 2022;7(3):33. (In Russian).

Информация о соавторах:

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний Филиала Института биоорганической химии РАН

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

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

Хлынцова Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии 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

Романенко Яна Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Alexey K. Surin, PhD in physics and mathematics, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology; Senior Researcher, Laboratory of Biological Testing, Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Maria A. Shkuratova, Junior 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

Anna E. Khlyntseva, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Yana O. Romanenko, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Federal State Budgetary Scientific Institution "State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology" of Rosпотребнадзор

Биологические свойства полиантибиотикорезистентных *Staphylococcus haemolyticus*, изолированных от коронапозитивных и коронанегативных пациентов с внебольничными пневмониями

А.С.Анисимова, Н.В.Аронова, М.В.Цимбалистова, А.С.Водопьянов, Н.В.Павлович,
Е.Н.Гудуева, А.К.Носков

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

В настоящее время в инфекционной патологии человека возрастает роль коагулазоотрицательных видов *Staphylococcus* spp. Особого внимания из этой группы микроорганизмов заслуживает *Staphylococcus haemolyticus*, большинство клинических изолятов которого характеризуются полиантибиотикорезистентностью. Все исследованные штаммы выделены от коронапозитивных и коронанегативных больных с внебольничными пневмониями. Интерес вызывало сравнительное изучение чувствительности к антибактериальным препаратам у изолятов *S. haemolyticus* и *S. aureus*. Анализ полученных результатов показал, что, в отличие от полиантибиотикорезистентного гемолитического стафилококка, *S. aureus* обладал широким спектром чувствительности к изученным группам антибиотиков. Показано, что наибольшую резистентность (56–92%) штаммы *S. haemolyticus* проявляли к широко используемому антибиотикам: пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, тетрациклином, макролидам, фторхинолонам и амоксициклаву. Как установлено, наибольшую активность в отношении *S. haemolyticus* сохраняли ванкомицин и линезолид (100%), а >80% штаммов демонстрировали чувствительность к карбапенемам и цефоперазон/сульбактаму. Культуры обоих видов стафилококков проявляли чувствительность к коммерческому стафилококковому бактериофагу (73–100% штаммов). С помощью полногеномного секвенирования у гемолитических стафилококков обнаружены гены устойчивости к β-лактамам, аминогликозидам и макролидам. Кроме того, был выявлен ген устойчивости к дезинфицирующим средствам группы четвертичных аммониевых соединений – *qacA*, что свидетельствует о необходимости мониторинга подобных штаммов внутри стационаров. Исследование на вирулентность золотистого и гемолитического стафилококков на новой биологической модели – личинках большой восковой моли (*Galleria mellonella*) – не выявило достоверных отличий между видами. Таким образом, возрастающая частота изоляции полиантибиотикорезистентных гемолитических стафилококков от больных с пневмониями позволяет предложить их включение в группу наиболее опасных агентов – ESKAPE.

Ключевые слова: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, множественная лекарственная устойчивость, вирулентность, *Galleria mellonella*

Для цитирования: Анисимова А.С., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Павлович Н.В., Гудуева Е.Н., Носков А.К. Биологические свойства полиантибиотикорезистентных *Staphylococcus haemolyticus*, изолированных от коронапозитивных и коронанегативных пациентов с внебольничными пневмониями. Бактериология. 2024; 9(4): 88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-88-94

Biological properties of multidrug-resistance *Staphylococcus haemolyticus* isolated from coronapositive and coronanegative patients with community-acquired pneumonia

A.S.Anisimova, N.V.Aronova, M.V.Tsimbalistova, A.S.Vodopyanov, N.V.Pavlovich, E.N.Gudueva, A.K.Noskov

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Для корреспонденции:

Анисимова Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
E-mail: anisimova_as@antiplague.ru

Статья поступила 22.03.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Anastasia S. Anisimova, Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
E-mail: anisimova_as@antiplague.ru

The article was received 22.03.2024, accepted for publication 25.12.2024

Currently, the role of coagulase-negative species of *Staphylococcus* spp in human infectious pathology is increasing. From this group of microorganisms, *Staphylococcus haemolyticus* deserves special attention because most of the clinical isolates are characterized by multidrug-resistance (MDR). All of the studied strains were obtained from coronapostive and coronanegative patients with community-acquired pneumonia. Special interest in the investigation of these strains is focused on their antibiotic resistance. Our results showed that unlike MDR *S. haemolyticus*, *S. aureus* had a wide range of sensitivity to the tested antibiotic groups. It was established that *S. haemolyticus* strains demonstrated the greatest resistance (56–92%) to the wide range of antibiotics: penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and amoxicillin+clavulanic acid. Vancomycin and linezolid were found to be the most active against *S. haemolyticus* (100%), and more than 80% of the strains were sensitive to carbapenems and cefoperazone/sulbactam. Most of the clinical isolates of both staphylococci species (73–100%) were lysed by commercial staphylococcal bacteriophage. Genes of resistance to β -lactams, aminoglycosides and macrolides were found in hemolytic staphylococci using whole-genome sequencing. In addition, a gene *qacA*, which determines resistance to disinfectants of the quaternary ammonium compound group, was identified. These results indicate the necessity to control these strains in hospitals. A virulence study of *S. aureus* and *S. haemolyticus* using a new biological model – larvae of the large wax moth (*Galleria mellonella*) – did not reveal significant differences between two species. Thus, the increasing frequency of isolation of MDR hemolytic staphylococci from patients with pneumonia support the idea of their inclusion in the group of the most dangerous agents – ESKAPE.

Key words: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, multidrug-resistance, virulence, *Galleria mellonella*

For citation: Anisimova A.S., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., A.S.Vodopyanov A.S., Pavlovich N.V., Gudueva E.N., Noskov A.K. Biological properties of multidrug-resistance *Staphylococcus haemolyticus* isolated from coronapostive and coronanegative patients with community-acquired pneumonia. Bacteriology. 2024; 9(4): 88–94. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-88-94

Бактерии рода *Staphylococcus* spp. относятся к условно-патогенной микрофлоре и могут колонизировать различные ткани и органы здорового человека. В настоящее время их разделяют на две группы по способности коагулировать плазму крови – коагулазоположительные и коагулазоотрицательные (КОС). Следует отметить, что данные группы характеризуются разным патогенным потенциалом, причем к наиболее вирулентным среди коагулазопозитивных стафилококков относится *Staphylococcus aureus*. Подтверждением этому может служить включение этого вида в группу опасных антибиотикорезистентных микроорганизмов – ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие представители рода *Enterobacter*). Среди КОС клинически значимыми и широко распространенными являются виды *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* [1].

В последние годы в инфекционной патологии человека возрастает роль *S. haemolyticus*, с которым ассоциируют такие инфекции как бактериемия, менингит, инфекции глаз, кожи, мочевыводящих путей и перитонит [2–4]. Кроме того, имеются сведения о выделении гемолитического стафилококка от собак и их владельцев, что предполагает возможность зоонозной передачи возбудителя [5]. Особого внимания заслуживает тот факт, что данный вид микроорганизма, обладающий множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), был обнаружен в кормах для животных [6].

Гемолитический стафилококк рассматривается некоторыми авторами как «новый» патоген, который может вызывать внутрибольничные инфекции. Учитывая этиологическую значимость *S. aureus* и более пристальный интерес исследователей к этому виду, участию других стафилококков в развитии инфекционного процесса уделялось меньше внимания и не всегда проводилась их четкая микробиологическая идентификация [7].

Сегодня гемолитические стафилококки условно подразделяют на две формы – комменсальные и клинические. Клинические характеризуются полиантибиотикорезистентностью и могут быть источником распространения внутрибольничных инфекций [8]. Факторы, определяющие выжива-

ние и распространение *S. haemolyticus*, а также переход от комменсального к клиническому состоянию, до сих пор точно не установлены [7].

Биологической особенностью этого вида является образование биопленок, которые наряду с продукцией токсинов и инвазивных ферментов могут иметь решающее значение в развитии патогенеза заболевания [9]. Как установлено, внутрибольничные изоляты показывают высокий уровень антибиотикорезистентности среди представителей КОС [10]. Более того, они представляют угрозу горизонтального переноса генов резистентности другим видам стафилококков и их распространению как внутри стационара, так и среди населения.

Целью нашего исследования явилось определение этиологического значения *S. haemolyticus* в структуре возбудителей внебольничных пневмоний у коронапозитивных (SARS-CoV-2«+») и коронанегативных (SARS-CoV-2«-») больных и изучение фенотипических и молекулярно-биологических свойств клинических штаммов, а также сравнительная оценка чувствительности *S. haemolyticus* и *S. aureus* к антибактериальным препаратам, стафилококковому бактериофагу и определение вирулентности на модели инфекции личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella*).

Материалы и методы

В период пандемии новой коронавирусной инфекции (2020–2022 гг.) во ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора было исследовано 1468 образцов мокроты от пациентов с внебольничной пневмонией (ВП). Забор материала осуществлялся в первые 24–48 ч с момента поступления больного в стационар.

Выделение возбудителей ВП проводили бактериологическим методом в соответствии с регламентирующими документами [11, 12]. Диагностически значимыми считали микроорганизмы, изолированные из мокроты больных, в концентрации $\geq 10^5$ КОЕ/мл.

Для видовой идентификации штаммов применяли метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с

использованием масс-спектрометра Autoflexspeed III (BrukerDaltonics, Германия) и программного обеспечения MALDI Biotyper. Показатели полученных масс-спектров сравнивали с базой данных компании Bruker версия 3.1.66 (BrukerDaltonics, Германия) и при значении Score 2,0–2,3 оценивали вероятность видовой идентификации как высокую. Подготовку образцов выполняли методом прямого нанесения материала на мишень в соответствии с инструкцией к прибору.

Антибиотикорезистентность изолятов определяли с помощью диско-диффузионного метода с оценкой чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) в соответствии с критериями EUCAST v. 13.0 к следующим группам антибиотиков: пенициллины (ампициллин), цефалоспорины (цефотаксим), макролиды (азитромицин), аминогликозиды (гентамицин), тетрациклины (доксциклин), линкозамиды (клиндамицин), рифампицин, карбапенемы (имипенем, меропенем), фторхинолоны (левофлоксацин), беталактамазозащищенные β-лактамы (амоксциллин/клавуланат, цефоперазон/сульбактам), а также ванкомицину и линезолиду (производства НИЦФ, Санкт-Петербург) [13].

Для обнаружения β-лактамазы расширенного спектра действия у исследованных штаммов использовали диски с хромогенным цефалоспорином (нитроцефином), согласно инструкции изготовителя (BD, США).

Поиск генов резистентности осуществляли с помощью программы на сайте <http://antiplague.ru/resistanceanalyzer/>.

Литическую активность коммерческого стафилококкового бактериофага (производства «Микроген») изучали с помощью прямого метода нанесения капли бактериофага на посев исследуемой культуры (10^8 КОЕ/мл), согласно Федеральным клиническим рекомендациям [14].

Определение MLST-типа штаммов проводили с использованием авторского программного обеспечения MLST-typer (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора) и базы данных pubMLST [15].

Вирулентность клинических штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* оценивали на модели экспериментальной инфекции личинок большой восковой моли (*G. mellonella*) при заражении в дозе 10^5 КОЕ/личинку в последнюю левую ложноножку по 5 мкл (10 личинок в группе). В качестве кон-

троля использовали группы интактных особей и с введенным физиологическим раствором в том же объеме. Учет гибели *G. mellonella* регистрировали с 24-часовыми интервалами в течение 5 дней [16]. Анализ выживаемости проводили методом Каплана–Мейера с построением кривой и последующей оценкой межгрупповых различий логранговым тестом. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [17].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Z-теста и критерия χ^2 Пирсона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$ [17].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенной работы было исследовано 1468 образцов мокроты от коронапозитивных ($n = 1015$) и коронанегативных больных ($n = 453$) с ВП. Анализ этиологической структуры возбудителей ВП представлен на рис. 1.

Установлено, что в структуре ВП из группы грамотрицательных микроорганизмов доминирующее место занимали бактерии рода *Klebsiella* spp., что подтверждает полученные нами ранее данные [18]. Из грамположительных бактерий 26% как у коронапозитивных, так и коронанегативных пациентов составляли *Staphylococcus* spp.

В диагностических количествах было изолировано 119 штаммов *Staphylococcus* spp.: 79 от коронапозитивных больных и 40 – от коронанегативных. Анализ их видового спектра показал, что наибольший процент выделения приходился на *S. aureus* (79%), а среди КОС наиболее часто выделялся *S. haemolyticus* (17%). Другие виды (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) составляли 4%. Вместе с тем не выявлено достоверной разницы в частоте выделения стафилококков между двумя группами больных ($p > 0,05$).

Изучение отношения клинических изолятов к АБП показало, что штаммы гемолитического стафилококка в обеих группах пациентов характеризовались достоверно ($p \leq 0,05$) большим количеством маркеров устойчивости по сравнению с *S. aureus*. В то же время изолированные стафилококки от больных из обеих групп имели сопоставимые спектры чувствительности/устойчивости к лекарственным препаратам (рис. 2, 3).

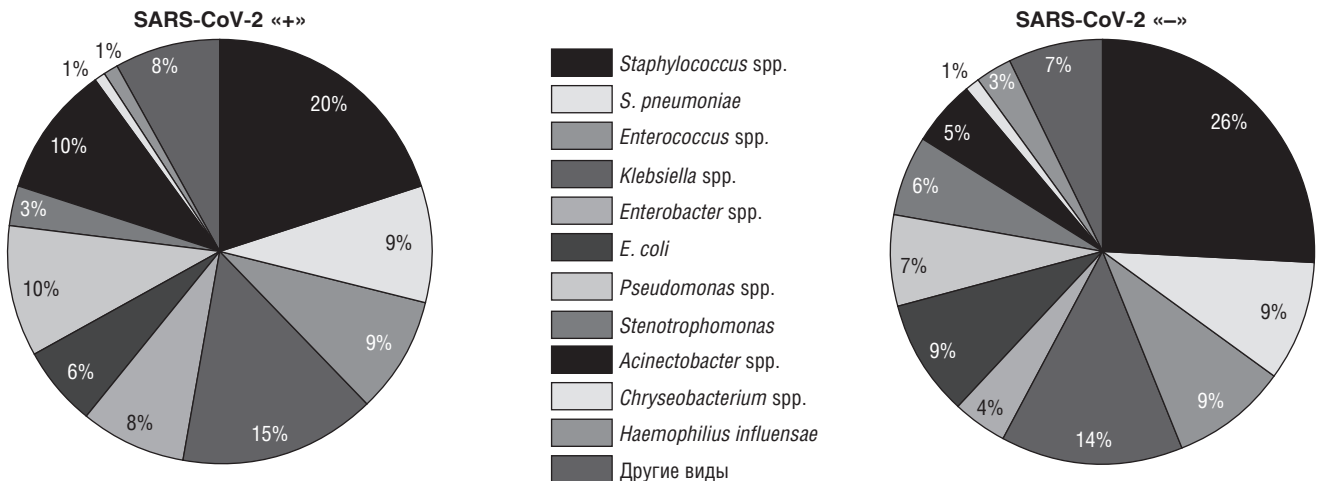


Рис. 1. Этиологическая структура возбудителей внебольничных пневмоний у коронапозитивных и коронанегативных больных.
 Fig. 1. Etiological structure of pathogens causing community-acquired pneumonia in corona-positive and corona-negative patients.

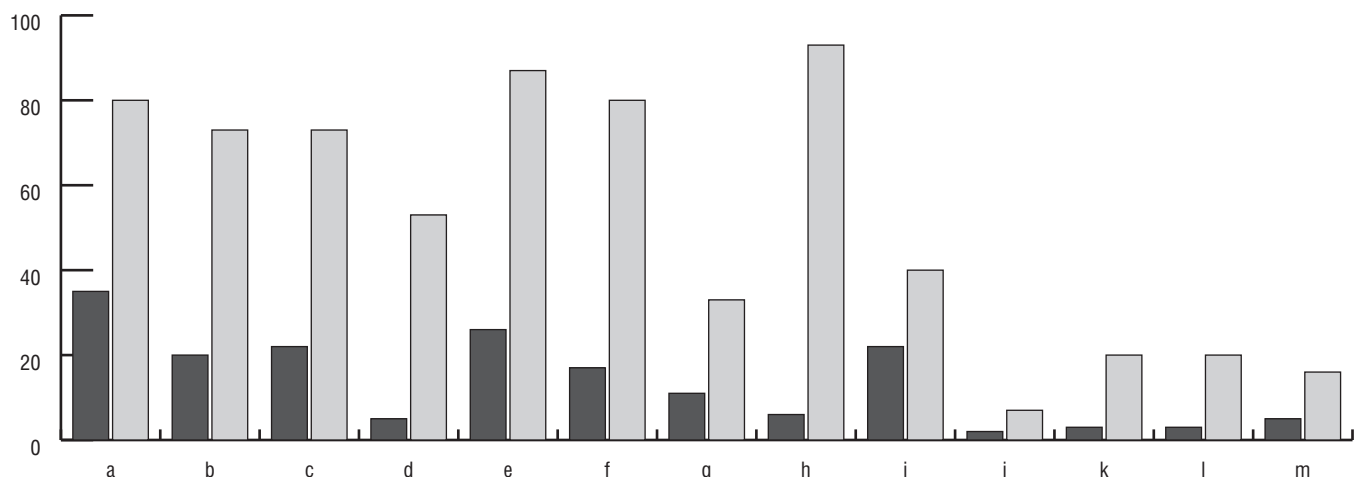


Рис. 2. Результаты сравнительной оценки антибиотикорезистентности штаммов *S. haemolyticus* (■) и *S. aureus* (■) у SARS-CoV-2«+»-больных: а – ампициллин, б – амоксилав, с – цефотаксим, d – гентамицин, е – доксициклин, f – азитромицин, g – клиндамицин, h – левофлоксацин, i – рифампицин, j – левомицитин, k – имипенем, l – меропенем, m – цефоперазон/сульбактам.

Fig. 2. Results of a comparative assessment of antibiotic resistance of *S. haemolyticus* (■) and *S. aureus* (■) strains in SARS-CoV-2“+” patients: a – ampicillin, b – amoxiclav, c – cefotaxime, d – gentamicin, e – doxycycline, f – azithromycin, g – clindamycin, h – levofloxacin, i – rifampicin, j – levomycin, k – imipenem, l – meropenem, m – cefoperazone/sulbactam.

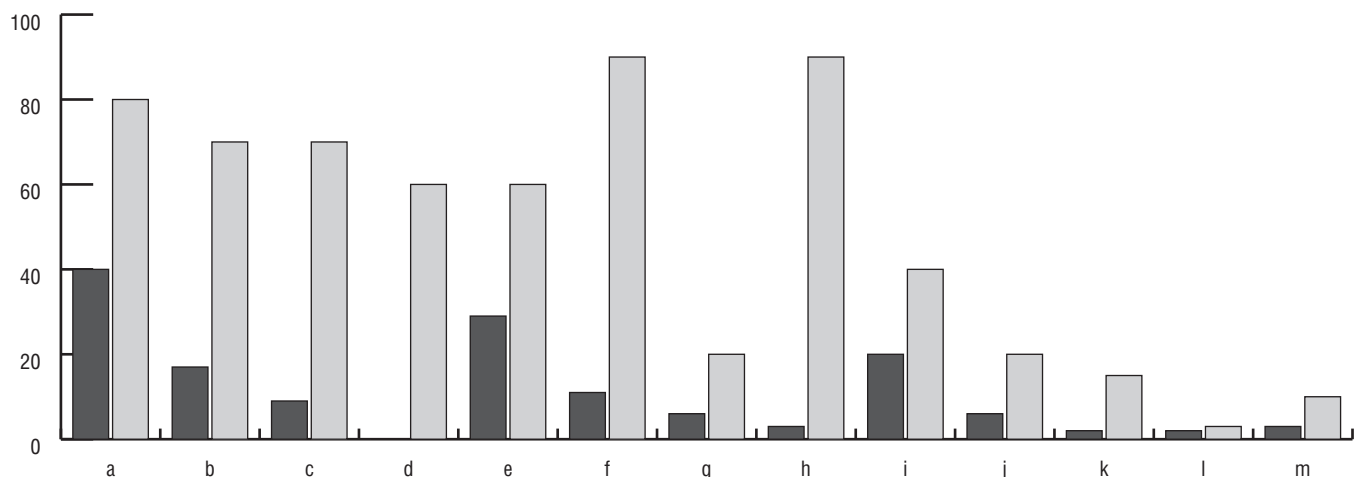


Рис. 3. Результаты сравнительной оценки антибиотикорезистентности штаммов *S. haemolyticus* (■) и *S. aureus* (■) у SARS-CoV-2«-»-больных: а – ампициллин, б – амоксилав, с – цефотаксим, d – гентамицин, е – доксициклин, f – азитромицин, g – клиндамицин, h – левофлоксацин, i – рифампицин, j – левомицитин, k – имипенем, l – меропенем, m – цефоперазон/сульбактам.

Fig. 3. Results of a comparative assessment of antibiotic resistance of *S. haemolyticus* (■) and *S. aureus* (■) strains in SARS-CoV-2“-” patients: a – ampicillin, b – amoxiclav, c – cefotaxime, d – gentamicin, e – doxycycline, f – azithromycin, g – clindamycin, h – levofloxacin, i – rifampicin, j – levomycin, k – imipenem, l – meropenem, m – cefoperazone/sulbactam.

Как оказалось, наибольшую резистентность (56–92% штаммов) *S. haemolyticus* проявляли к пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, фторхинолонам и амоксилаву.

С помощью дисков с нитроцефином доказано, что все антибиотикорезистентные гемолитические стафилококки синтезировали β-лактамазы расширенного спектра действия, что может определять устойчивый фенотип стафилококков к β-лактамам антибиотикам. Частота выделения изолятов, устойчивых к клиндамицину и рифампицину, составляла 28–40%. Как установлено, наибольшую активность в отношении *S. haemolyticus* сохраняли ванкомицин и линезолид (100%), а >80% штаммов демонстрировали чувствительность к карбапенемам и цефоперазон/сульбактаму. Эти результаты позволяют рассматривать данные антибиотики как препараты выбора при лечении инфекции.

В отличие от гемолитического стафилококка, *S. aureus* показал более низкую частоту изоляции антибиотикорезистентных штаммов и характеризовался большей чувствительностью к изученным группам антибиотиков. Так, 26–40% исследованных культур обладали резистентностью к пенициллинам и тетрациклинам. Следует отметить, что у корона-позитивных больных отмечена тенденция к повышению частоты изоляции резистентных к цефалоспорином штаммов (до 22%) по сравнению с коронанегативными (9%). Наши результаты согласуются с данными других авторов, в которых сообщалось, что >70% клинических и комменсальных штаммов *S. haemolyticus* были МЛУ [19, 20]. Таким образом, целесообразным является микробиологический мониторинг циркулирующих штаммов стафилококков с оценкой их чувствительности к АБП для своевременной смены антибиотиков при лечении.

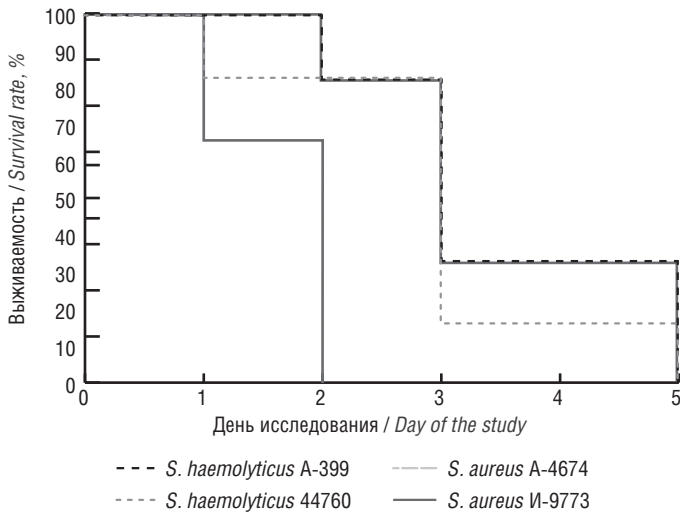


Рис. 4. Кривая выживаемости личинок экспериментальных групп, зараженных суспензиями штаммов *S. haemolyticus* и *S. aureus* (10^5 КОЕ/личинку).

Fig. 4. Survival curve of larvae of experimental groups infected with suspensions of *S. haemolyticus* and *S. aureus* (10^5 CFU/larva).

С помощью полногеномного секвенирования были проанализированы гены резистентности *S. haemolyticus*. Как обнаружено, геном бактерий содержал гены устойчивости к β-лактамам, аминогликозидам и макролидам, что подтверждает результаты фенотипической характеристики (таблица).

Следует подчеркнуть тот факт, что у 63% гемолитических стафилококков выявлен ген устойчивости к дезинфицирующим средствам группы четвертичных аммониевых соединений – *qacA*. В этой связи можно предположить, что клинические изоляты, способные быстро адаптироваться к различным неблагоприятным условиям, могут проявлять устойчивость к применяемым на практике дезинфектантам (например, Асептодину). Данный феномен требует особого внимания, так как существует вероятность появления устойчивых микроорганизмов в клинических условиях.

Большинство культур обоих видов стафилококков проявляли чувствительность к коммерческому стафилококковому бактериофагу (73–100% штаммов). Следовательно, определение фагочувствительности конкретного возбудителя и использование бактериофага может повысить эффективность комплексного лечения стафилококковой инфекции.

Для изучения молекулярно-генетических свойств было проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *S. haemolyticus*. С помощью мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) были определены 8 различных сиквенс-типов (ST) (8, 29, 30, 39, 40, 42, 58, 97). Как установлено, в исследуемой коллекции преобладали штаммы, относящиеся к ST 8 и ST 42. По мнению некоторых авторов, именно ST 42 являются наиболее патогенными по сравнению с другими сиквенс-типами [20]. У трех штаммов нам не удалось определить ST-тип, так как у них были обнаружены новые аллели генов *arcC* и *SH_1200*, не зарегистрированных в базе данных.

Таблица. Анализ генов резистентности к антибактериальным препаратам у *S. haemolyticus*
Table. Analysis of antibacterial resistance genes in *S. haemolyticus*

№ п/п	Номер штамма / Strain number	β-лактамы / β-lactams				Аминогликозиды / Aminoglycosides					Макролиды / Macrolides				Тетрациклины / Tetracyclines		Линкозамиды / Lincosamides				
		<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaR1</i>	<i>mecA</i>	<i>blaPC1</i>	<i>str</i>	<i>aac(6)-Ie/aph(2'')-Ia</i>	<i>ant(9)-Ia</i>	<i>aadD1</i>	<i>aph(3)-IIIa</i>	<i>sat4</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>erm(A)</i>	<i>erm(C)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>msr(A)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>vga(A)</i>	<i>lnu(A)</i>
1	44715	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
2	44760	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
3	44936	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
4	72133	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
5	72145	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
6	И8212	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	
7	A104	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	
8	A2303	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	
9	A3796	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	
10	A399	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	
11	A403	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
12	E4096	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	
13	E4316	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	
14	E4437	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
15	E4786	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
16	E4790	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
Частота встречаемости генов резистентности, % / Frequency of resistance genes, %		31	94	86	94	63	6	69	16	25	50	50	50	6	69	75	75	38	25	19	38

Согласно сведениям литературы, стафилококки являются слабопатогенными для белых мышей в дозе $<10^8$ – 10^9 КОЕ/мл [21, 22]. Поэтому представляло интерес изучение их вирулентности на новой биологической модели – личинках большой восковой моли (*G. mellonella*), которая в последние годы все более широко используется в лабораторной практике [23] (рис. 4).

Сравнительное изучение вирулентности золотистого и гемолитического стафилококков на модели *G. mellonella* не выявило достоверных отличий. Тем не менее по сравнению с другими штаммами *S. aureus* И-9773 вызывал более быструю гибель всей группы, что свидетельствует о различной степени вирулентности изученных культур для этой модели (рис. 4). В контрольных группах меланизация и гибель личинок отсутствовали. В отличие от полученных нами результатов, по данным китайских исследователей гемолитический стафилококк по сравнению с *S. aureus* проявлял большую вирулентность для *G. mellonella* [20]. Подобное расхождение результатов, возможно, обусловлено межштаммовыми различиями, что диктует необходимость дальнейшего изучения патогенного потенциала стафилококков на этой модели.

Ранее считалось, что представители КОС являются слабопатогенными для человека, а клинический интерес представлял *S. aureus*. Именно он включен в группу шести опасных жизнеугрожающих полиантибиотикорезистентных патогенов ESKAPE. Но результаты проведенного исследования четко демонстрируют, что гемолитические стафилококки обладают наибольшим количеством маркеров резистентности, тогда как *S. aureus* имеет широкий спектр чувствительности к различным АБП. При этом в последние годы отмечается возрастающая роль *S. haemolyticus* в качестве инфекционного агента при внебольничных и внутрибольничных пневмониях, которые плохо поддаются этиотропной терапии [24]. На наш взгляд, целесообразным является рассмотрение вопроса о включении *S. haemolyticus* в группу ESKAPE наряду с *S. aureus*.

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 / References

1. Montelongo C, Mores CR, Putonti C, Wolfe AJ, Abouelfetouh A. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus*. *Clinical Isolates from Egypt*. *Microbiol Spectr*. 2022 Aug 31;10(4):e0241321. DOI: 10.1128/spectrum.02413-21
2. Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, Dos Santos KR. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Apr;52(3):431-5. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00387.x
3. do Carmo Ferreira N, Schuenck RP, dos Santos KR, de Freire Bastos Mdo C, Giambiagi-deMarval M. Diversity of plasmids and transmission of high-level mupirocin *mupA* resistance gene in *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Mar;61(2):147-52. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00756.x
4. Manoharan M, Sistla S, Ray P. Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. *Microb Drug Resist*. 2021 Apr;27(4):501-508. DOI: 10.1089/mdr.2019.0395
5. Ruzauskas M, Siugzdiniene R, Klimiene I, Virgailis M, Mockeliunas R, Vaskeviciute L, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in companion animals: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014 Nov 28;13:56. DOI: 10.1186/s12941-014-0056-y
6. Bhargava K, Zhang Y. Multidrug-resistant coagulase-negative Staphylococci in food animals. *J Appl Microbiol*. 2012 Nov;113(5):1027-36. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05410.x
7. Eltwisy HO, Twisy HO, Hafez MH, Sayed IM, El-Mokhtar MA. Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*. 2022 May 31;10(6):1130. DOI: 10.3390/microorganisms10061130
8. Cavanagh JP, Pain M, Askarian F, Bruun JA, Urbarova I, Wai SN, et al. Comparative exoproteome profiling of an invasive and a commensal *Staphylococcus haemolyticus* isolate. *J Proteomics*. 2019 Apr 15;197:106-114. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.11.013
9. Eltwisy HO, Abdel-Fattah M, Elsisy AM, Omar MM, Abdelmoteleb AA, El-Mokhtar MA. Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cells. *Virulence*. 2020 Dec;11(1):1142-1157. DOI: 10.1080/21505594.2020.1809962
10. Cavanagh JP, Wolden R, Heise P, Esaiassen E, Klingenberg C, Aarag Fredheim EG. Antimicrobial susceptibility and body site distribution of community isolates of coagulase-negative staphylococci. *APMIS*. 2016 Nov;124(11):973-978. DOI: 10.1111/apm.12591
11. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания МУК 4.2.3115–13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. / *Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnykh pnevmonii: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.3115–13. M.: Federal'nyi tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2014. (In Russian).*
12. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии: Методические рекомендации МР 4.2.0114-16. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017. / *Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnoi pnevmonii pnevmokokkovoi etiologii: Metodicheskie rekomendatsii MR 4.2.0114-16. M.: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchiya cheloveka, 2017. (In Russian).*
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. Access: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
14. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике: Федеральные клинические рекомендации. М., 2014 / *Ratsional'noe primeneniye bakteriofagov v lechebnoi i protivoepidemicheskoi praktike: Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. M., 2014. (In Russian).*
15. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018 Sep 24;3:124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
16. Салмова ЮВ, Никифорова ЛР, Боровкова КЕ. Разработка модели бактериальной инфекции личинок *Galleria mellonella* (большая восковая моль). Лабораторные животные для научных исследований. 2022;3:40-49 / *Salmova JV, Nikiforova LR, Borovkova KE. Development of a bacterial infection model of *Galleria mellonella* larvae (greater wax moth). Laboratory Animals for Science. 2022;3:40-49. DOI: 10.57034/2618723X-2022-03-05 (In Russian).*
17. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: ИД Практика, 1998. / *Glantz SA. Primer of biostatistics. Translation from English. M.: Publ. Praktika, 1998. (In Russian).*

18. Анисимова АС, Павлович НВ, Аронова НВ, Цимбалистова МВ, Гудуева ЕН, Пасюкова НИ, и др. Биологические свойства и антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* и ее роль в этиологической структуре возбудителей внебольничных пневмоний. Антибиотики и химиотер. 2023;68(5-6):11-18. / Anisimova AS, Pavlovich NV, Aronova NV, Tsimbalistova MV, Gudueva EN, Pasyukova NI, et al. Biological Properties and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* and Its Role in the Etiological Structure of Community-Acquired Pneumonia Pathogens. Antibiot. khimioter. (Antibiotics and Chemotherapy). 2023;68(5-6):11-18. DOI: 10.37489/0235-2990-2023-68-5-6-11-18 (In Russian).
19. Pain M, Hjerde E, Klingenberg C, Cavanagh JP. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus haemolyticus* reveals key to hospital adaptation and pathogenicity. Front Microbiol. 2019 Sep 10;10:2096. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02096. 17.
20. Qin M, Chen P, Deng B, He R, Wu Y, Yang Y, et al. The Emergence of a Multidrug-Resistant and Pathogenic ST42 Lineage of *Staphylococcus haemolyticus* from a Hospital in China. Microbiol Spectr. 2022 Jun 29;10(3):e0234221. DOI: 10.1128/spectrum.02342-21
21. Gunn BA. Comparative virulence of human isolates of coagulase-negative staphylococci tested in an infant mouse weight retardation model. J Clin Microbiol. 1989 Mar;27(3):507-11. DOI: 10.1128/jcm.27.3.507-511.1989
22. Akinkunmi EO, Adeyemi OI, Igbeneghu OA, Olaniyan EO, Omonisi AE, Lamikanra A. The pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* on the intestinal organs of rats and mice: an experimental investigation. BMC Gastroenterol. 2014 Jul 12;14:126. DOI: 10.1186/1471-230X-14-126
23. Asai M, Li Y, Newton SM, Robertson BD, Langford PR. *Galleria mellonella*-intracellular bacteria pathogen infection models: the ins and outs. FEMS Microbiol Rev. 2023 Mar 10;47(2):fuad011. DOI: 10.1093/femsre/fuad011
24. Noshak MA, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Mirzaii M, Memar MY, et al. Molecular Detection and Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Isolated from Hospitalized Patients and Healthcare Workers in Iran. Biomed Res Int. 2023 Jan 6;2023:3775142. DOI: 10.1155/2023/3775142

Информация о соавторах:

Аронова Надежда Валентиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Гудуева Елена Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Носков Алексей Кимович, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Nadezhda V. Aronova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

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

Alexey S. Vodopyanov, MD, PhD, Leading Researcher at the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

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

Elena N. Gudueva, Junior researcher at the laboratory "Collection of pathogenic microorganisms" Federal State Institution Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Alexey K. Noskov, MD, PhD, Director of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ**Пробиотический потенциал и применение молочнокислых бактерий в созревших сырах**

В традиционных молочных продуктах имеются огромные источники молочнокислых бактерий (LAB). Некоторые из этих штаммов могут быть новыми пробиотиками с применением в области здравоохранения и удовлетворять растущие потребности пробиотической промышленности. В этой работе были проанализированы пробиотические и технологические свойства трех штаммов *Lactobacilli*, выделенных из традиционных бразильских сыров. Тесты *in vitro* показали, что три штамма безопасны и обладают пробиотическими свойствами. Они продемонстрировали антимикробную активность против патогенных бактерий, значения автоагрегации около 60%, высокие свойства образования биопленки и выживаемость более 65% в имитируемых кислотных условиях и более 100% в желчных солях. Три штамма использовались в качестве дополнительных культур по отдельности в пилотном производстве сыра Прато. После 45 дней созревания количество лактобацилл в сырах было близко к 8 Log КОЕ/г, и наблюдалось снижение количества лактококков (около -3 Log КОЕ/г) в зависимости от штамма. Первичный и вторичный протеолиз сыра не был затронут пробиотическими кандидатами во время созревания, и штаммы не показали липолитического эффекта, поскольку не наблюдалось никаких изменений в профиле жирных кислот сыров. Таким образом, эти результаты показывают, что три исследованных штамма обладают пробиотическими свойствами и имеют потенциал в качестве дополнительных нестартерных молочнокислых бактерий (NSLAB) для улучшения качества и функциональности сыров с короткой выдержкой.

Barreto Pinilla CM, Brandelli A, Ataíde Isaia H, Guzman F, Sundfeld da Gama MA, Spadoti LM, et al. Probiotic Potential and Application of Indigenous Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Ripened Short-Aged Cheese. Curr Microbiol. 2024 Jun 3;81(7):202.

DOI: 10.1007/s00284-024-03729-2

Частота встречаемости и особенности лабораторной диагностики *Mycoplasma pneumoniae* у пациентов с внебольничной пневмонией на территории Луганской Народной Республики

А.А.Востриков¹, В.В.Бондаренко², А.В.Хохлова³

¹ГБУЗ «Луганский республиканский центр экстренной медицинской помощи и медицины катастроф», Луганская Народная Республика, Луганск, Российская Федерация;

²ГБУЗ «Луганская республиканская детская клиническая больница», Луганская Народная Республика, Луганск, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «Луганский государственный педагогический университет», Луганская Народная Республика, Луганск, Российская Федерация

В статье представлены особенности лабораторной диагностики и встречаемости *Mycoplasma pneumoniae* как возбудителя внебольничной пневмонии. В Луганской Народной Республике общая частота встречаемости *M. pneumoniae* у пациентов с установленным диагнозом «внебольничная пневмония» составила 23,08% (463 из 2006 проб), практически у каждого четвертого пациента была обнаружена ДНК *M. pneumoniae*. Основным возрастным диапазоном, входящим в зону риска, составил от 7 до 26 лет, именно в этом возрастном сегменте регистрировалось большинство случаев инфицирования *M. pneumoniae*. Максимальная частота встречаемости была зафиксирована в возрасте 15–17 лет, где в среднем каждый второй ребенок был инфицирован *M. pneumoniae*.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, *Mycoplasma pneumoniae*, диагностика, заболеваемость, полимеразная цепная реакция, ДНК

Для цитирования: Востриков А.А., Бондаренко В.В., Хохлова А.В. Частота встречаемости и особенности лабораторной диагностики *Mycoplasma pneumoniae* у пациентов с внебольничной пневмонией на территории Луганской Народной Республики. Бактериология. 2024; 9(4): 95–99. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-95-99

Frequency of occurrence and peculiarities of laboratory diagnostics of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with out-of-hospital pneumonia on the territory of the Lugansk People's Republic

A.A.Vostrikov¹, V.V.Bondarenko², A.V.Khokhlova³

¹Lugansk Republican Center for Emergency Medical Care and Disaster Medicine, Lugansk, Lugansk People's Republic, Russian Federation;

²Lugansk Republican Children's Clinical Hospital, Lugansk, Lugansk People's Republic, Russian Federation;

³Lugansk State Pedagogical University, Lugansk, Lugansk People's Republic, Russian Federation

The article presents the peculiarities of laboratory diagnosis and occurrence of *Mycoplasma pneumoniae* as a causative agent of community-acquired pneumonia. In the Lugansk People's Republic, the general frequency of *M. pneumoniae* occurrence in

Для корреспонденции:

Востриков Алексей Андреевич, заведующий молекулярно-генетической лабораторией, ГБУЗ «Луганский республиканский центр экстренной медицинской помощи и медицины катастроф»

Адрес: 291005, Луганская Народная Республика, Луганск, ул. Щаденко, 10а
Телефон: (022) 50-8110

Статья поступила 14.05.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Alexey A. Vostrikov, Head of the Molecular Genetic Laboratory, State Budgetary Healthcare Institution Lugansk Republican Center for Emergency Medical Care and Disaster Medicine

Address: 10a Shchadenko str., Lugansk, Lugansk People's Republic, 291005, Russian Federation
Phone: (022) 50-8110

The article was received 14.05.2024, accepted for publication 25.12.2024

patients diagnosed with out-of-hospital pneumonia was 23.08% (463 out of 2006 samples), almost every fourth patient had *M. pneumoniae* DNA detected. The main age range included in the risk zone was from 7 to 26 years old, exactly in this age segment most cases of *M. pneumoniae* infection were registered. The maximum frequency of occurrence was recorded at the age of 15–17 years, where on average every second child was infected with *M. pneumoniae*.

Key words: community-acquired pneumonia, *Mycoplasma pneumoniae*, diagnosis, morbidity, PCR, DNA

For citation: Vostrikov A.A., Bondarenko V.V., Khokhlova A.V. Frequency of occurrence and peculiarities of laboratory diagnostics of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with out-of-hospital pneumonia on the territory of the Lugansk People's Republic. Bacteriology. 2024; 9(4): 95–99. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-95-99

В настоящее время научный интерес к внебольничной пневмонии (ВП) как причине роста заболеваемости и смертности во всем мире остается предельно высоким. В регионах Америки и Европы на пневмонию приходится до 12% случаев смерти. Несмотря на технологические достижения в микробиологической диагностике, этиология этого заболевания остается недостаточно изученной, а терапия носит эмпирический характер, основанный на клинических и эпидемиологических особенностях заболевания [1].

Mycoplasma pneumoniae является частой причиной ВП, в основном у детей и подростков. В периоды эпидемий на нее также приходится значительная доля острых инфекций дыхательных путей во всех возрастных группах. *M. pneumoniae* способна вызывать от 2 до 40% случаев ВП. Кроме того, у ~25% пациентов, инфицированных *M. pneumoniae*, наблюдаются различные осложнения [2, 3]. *M. pneumoniae* встречается на протяжении всего года с наибольшей долей инфекции в осенний период времени [4]. На сегодняшний день инфекции, вызванные *M. pneumoniae*, эндемичны во всем мире. В Азии, Европе и США была описана циклическая картина эпидемий с интервалом в 4–8 лет [5].

Бактерия *M. pneumoniae* не чувствительна к β-лактамам и ко всем антимикробным препаратам, мишенью действия которых является клеточная стенка, таким как гликопептиды и фосфомицин, регулярно используемые для лечения пневмонии [6]. *M. pneumoniae* также резистентна к сульфаниламидам, полимиксинам, триметоприму, рифампицину и линезолиду [7]. На основании данных, полученных китайскими и японскими учеными, регистрируется рост устойчивости *M. pneumoniae* к макролидам, которая составляет 12,3–23%. Однако макролиды остаются препаратами первой линии для лечения инфекции, вызванной *M. pneumoniae*, наряду с линкозамидами, стрептограминами и кетолидами, тетрациклинами и фторхинолонами [8–10]. Данная тенденция лишней раз подчеркивает высокую актуальность изучения *M. pneumoniae* как патогена и лабораторной диагностики вызванных им инфекций.

Инфекции *M. pneumoniae* в клинике практически невозможно отличить от инфекций, вызванных вирусными или другими бактериальными агентами [4]. В большинстве случаев подозрение на пневмонию, вызванную *M. pneumoniae* (MP-инфекция), возникает на основании клинических и рентгенологических данных. В. Medjo et al. демонстрируют, что рентгенологическое исследование пациентов с MP-пневмонией и с пневмонией, вызванной другими патогенами, достоверных различий не показывает. Авторы указывают и на отсутствие различий в неспецифической лабораторной диагностике, а именно в уровне лейкоцитов, тромбоцитов, С-реактивного белка и т.д., между пациентами с MP-инфекцией и другими возбудителями пневмонии [4].

Специфическая лабораторная диагностика MP-инфекции в клинической практике основана на серологических, бактериологических и молекулярно-генетических исследованиях, каждое из которых имеет определенные преимущества и недостатки [11]. Однако трактовка результатов при сочетании всех этих методов вызывает определенные сложности. Т.П. Atkinson et al. отмечают случаи отрицательных результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР) при положительном серологическом анализе (IgM «+» в острой фазе или IgG титр «+»). Исследователи приходят к выводу, что данное явление может быть вызвано исчезновением или низким уровнем концентрации *M. pneumoniae* в образце [12], различными типами ПЦР, генными мишенями, разными типами образца или моментом времени отбора образца [13].

К.В. Waites et al. регистрируют случаи положительных результатов ПЦР у серологически негативных детей, что может быть обусловлено низким специфическим иммунным ответом (в т.ч. иммуносупрессией) или выявлением носительства (колонизации) *M. pneumoniae*, а не самой инфекцией [14]. Также ученые из Нидерландов с использованием молекулярно-генетических методов обнаружили ДНК *M. pneumoniae* у 21% соматически здоровых детей [15], что также указывает на колонизацию, а не на наличие истинной инфекции. Кроме того, авторы обнаружили, что *M. pneumoniae* может сохраняться в ротоглотке до 4 мес. после перенесенного заболевания. Американские ученые утверждают, что у 56% здоровых детей в составе микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей присутствовала *M. pneumoniae* [16]. Однако в других исследованиях, наоборот, сообщалось о низкой доле носительства у здоровых людей [17].

Подсчитано, что уровни антител IgM достигают максимума между 3-й и 6-й неделями, а затем постепенно снижаются. Очевидно, что антитела IgM обычно повышаются при первом заражении *M. pneumoniae*, но их повышение минимально у пациентов, повторно инфицированных *M. pneumoniae*. Таким образом, следует пересмотреть полезность серологического теста (IgM) у детей старшего возраста и взрослых. Ожидается, что эти дети ранее подвергались воздействию бактерий, учитывая циклическую эпидемиологическую динамику *M. pneumoniae* [18]. L.Y. Chang et al. также сообщили о большом расхождении между результатами, полученными с использованием IgM и ПЦР. Только у 12,6% пациентов были получены положительные результаты по обоим тестам (сочетание титра IgG и ПЦР не изучалось). Таким образом, мы наблюдаем существенное расхождение между результатами серологических и молекулярно-генетических методов исследования. При этом ряд авторов рекомендуют использовать со-

четание диагностических методов исследования с целью истинной дифференциации острой инфекции от персистенции. В частности, для детей раннего возраста рекомендуется использовать исследования на наличия антител класса IgM (в некоторых случаях парные сыворотки) совместно с ПЦР, а для взрослых – исследовать парные сыворотки на наличие антител класса IgG (титр) в сочетании с ПЦР. Однако данное сочетание требует дальнейшего изучения и дискуссий. Выбор методов диагностики является прерогативой лечащего врача, владеющего полной информацией о пациенте.

Важно отметить, что бактериологический метод в рутинной практике практически не используется, так как *M. pneumoniae* относится к трудно культивируемым бактериям. В случае применения бактериологического метода срок выполнения анализа доходит до 3 нед. [19].

В настоящее время отсутствуют единый алгоритм идентификации *M. pneumoniae* и программа эпидемиологического мониторинга данного патогена. Многие инфекции и даже вспышки без лабораторного подтверждения ошибочно приписываются *M. pneumoniae*. Следовательно, точная частота встречаемости инфекций, вызванных *M. pneumoniae*, при ВП остается малоизученной.

Цель исследования – провести скрининг встречаемости *M. pneumoniae* у детей и взрослых с внебольничной пневмонией, постоянно проживающих на территории Луганской Народной Республики.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе молекулярно-генетической лаборатории ГБУЗ «Луганский республиканский центр экстренной медицинской помощи и медицины катастроф» Луганской Народной Республики с января по март 2024 г. Выборка для исследования включала образцы, поступившие в молекулярно-генетическую лабораторию от больных с ВП со всей территории Луганской Народной Республики, и составила 2006 образцов. Материалом для исследования являлся мазок с задней стенки ротоглотки и носоглотки. Для обнаружения *M. pneumoniae* использовали метод амплификации нуклеиновых кислот – ПЦР в реальном времени. Экстракцию и очистку ДНК *M. pneumoniae* из образцов проводили с помощью автоматической магнитной станции выделения нуклеиновых кислот KingFisher Flex 96 Thermo Fisher Scientific с использованием наборов реактивов производства «ДНК-технология» (Россия) «ПРОБА-МЧ DWP», серия K26P3-2M. Для амплификации и детекции использовали термоциклеры (амплификаторы) Real-Time CFX96 Touch компании Bio-Rad с использованием тест-систем производства ООО «НекстБио» «АмплиПрайм *M. pneumoniae*/C. pneumoniae/S. pneumoniae/H. influenzae», серия 128122302. Лабораторная диагностика осуществлялась со строгим соблюдением инструкций производителей к наборам тест-систем, руководств по качеству и других нормативных правовых актов в области лабораторной диагно-

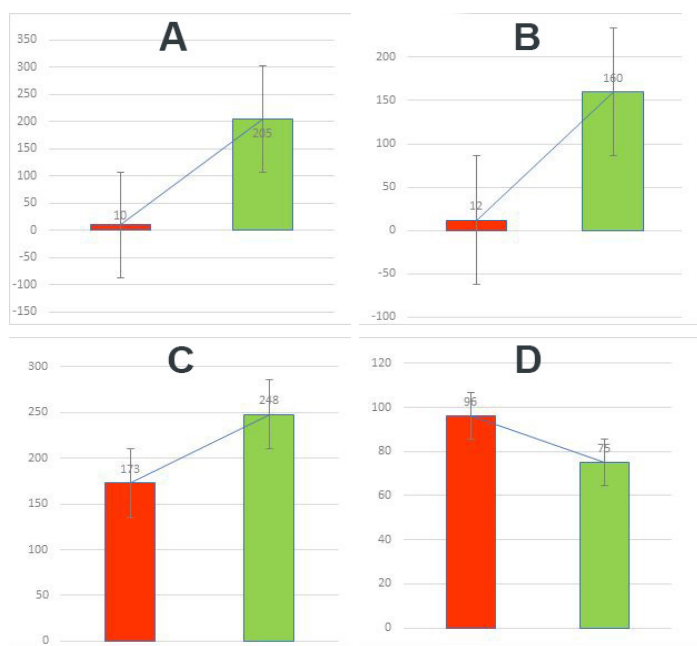


Рис. 1. Удельный вес *M. pneumoniae* у детей с внебольничной пневмонией в ЛНР за I квартал 2024 г.: А – с 0 до 2 лет ($n = 215$); В – с 3 до 6 лет ($n = 172$); С – с 7 до 14 лет ($n = 421$); D – с 15 до 17 лет ($n = 171$). ■ – *M. pneumoniae*; ■ – другие инфекции.
 Fig. 1. The proportion of *M. pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in the LPR in the first quarter of 2024: A – from 0 to 2 years old ($n = 215$); B – from 3 to 6 years old ($n = 172$); C – from 7 to 14 years old ($n = 421$); D – from 15 to 17 years old ($n = 171$). ■ – *M. pneumoniae*; ■ – other infections.

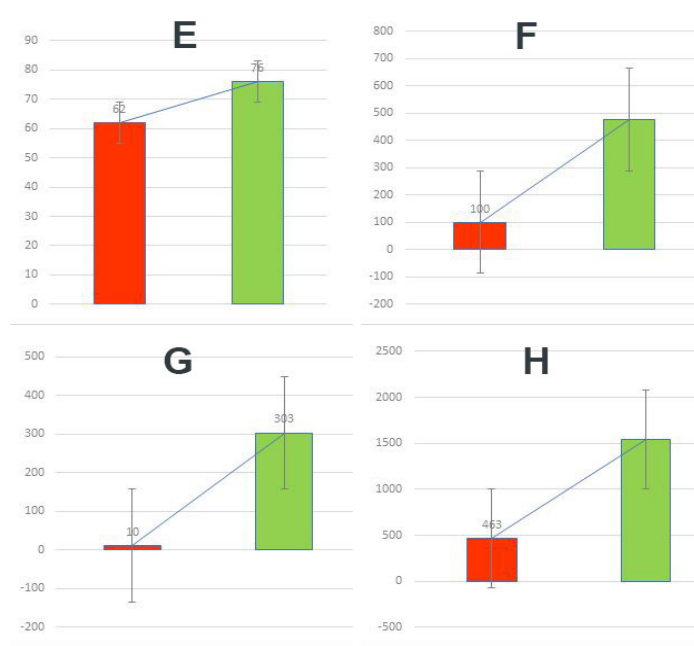


Рис. 2. Удельный вес *M. pneumoniae* у взрослых с внебольничной пневмонией в ЛНР за I квартал 2024 г.: E – с 18 до 26 лет ($n = 138$); F – с 27 до 64 лет ($n = 576$); G – от 65 лет ($n = 313$); H – всего у лиц с внебольничной пневмонией ($n = 2006$). ■ – *M. pneumoniae*; ■ – другие инфекции.
 Fig. 2. The proportion of *M. pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia in the LPR in the first quarter of 2024; E – from 18 to 26 years old ($n = 138$); F – from 27 to 64 years old ($n = 576$); G – from 65 years old ($n = 313$); H – in total in persons with community-acquired pneumonia ($n = 2006$). ■ – *M. pneumoniae*; ■ – other infections.

стики и биобезопасности. Все полученные данные обрабатывали в Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ результатов лабораторного исследования биологического материала из верхних дыхательных путей, отобранного у детей с ВП, на наличие ДНК *M. pneumoniae*, показал, что у детей от 0 до 2 лет выявили 10 (4,65%) проб положительных проб из 215, у детей от 3 до 6 лет – 12 (6,98%) проб из 172, у детей от 7 до 14 лет – 173 (41,09%) пробы из 421. Максимальная частота встречаемости *M. pneumoniae* была обнаружена у детей в возрасте от 15 до 17 лет и составила 96 (56,14%) положительных проб из 171 (рис. 1).

Результаты лабораторных исследований взрослого населения показали, что у взрослых в возрасте от 18 до 26 лет частота встречаемости ДНК *M. pneumoniae* была максимальной: ДНК возбудителя была обнаружена в 62 (44,93%) образцах из 138 (рис. 2, Е), в возрасте от 27 до 64 лет динамика встречаемости сократилась и составила 100 (17,36%) из 576 (рис. 2, F), у пациентов в возрасте от 65 лет регистрируется минимальная частота встречаемости среди взрослого населения – 10 (3,19%) положительных проб из 313 (рис. 2, G).

Общая частота встречаемости *M. pneumoniae* у пациентов с установленным диагнозом ВП составила 23,08% (463 из 2006 проб), практически у каждого четвертого пациента была обнаружена ДНК *M. pneumoniae* (рис. 2, H). Достоверных различий встречаемости *M. pneumoniae* между мужчинами и женщинами не выявлено: 52,2% случаев у мужчин и 47,8% у женщин.

Заключение

Полученные результаты показали нам частоту встречаемости *M. pneumoniae* у больных ВП по всем возрастным группам. Из полученных данных следует, что основной возрастной диапазон, входящий в зону риска, составил от 7 до 26 лет. Именно в этом возрастном сегменте регистрировалось большинство случаев инфицирования *M. pneumoniae*. Максимальная частота встречаемости была зафиксирована в возрасте 15–17 лет, где каждый второй ребенок, а иногда и чаще, был инфицирован *M. pneumoniae*.

Вероятно, повышенная частота встречаемости патогена обусловлена ослаблением коллективного иммунитета к *M. pneumoniae* из-за пандемии COVID-19 в 2020–2022 гг., наряду с эпидемией гриппа в 2022–2023 гг.

Перспективы дальнейших исследований

С учетом особенностей лабораторной диагностики полученные данные несут в себе неполную картину истинной частоты встречаемости *M. pneumoniae* как возбудителя ВП. Отсутствие характерных рентгенологических методов диагностики *M. pneumoniae*, рутинных неспецифических лабораторных тестов, которые отличали бы пневмонию, вызванную *M. pneumoniae*, от пневмонии, ассоциированной с другими возбудителями, а также отсутствие четкого алгоритма диагностики делают необходимым персонифицированный подход к диагностике. При этом необходимо учитывать целый ряд факторов, таких как возраст пациента, тропность

микроба, особенности иммунного статуса, начало заболевания, эпидемиологический статус и т.д.

Таким образом, необходимо пересмотреть подход к диагностике *M. pneumoniae*, с учетом чувствительности и специфичности различных методов, рационального сочетания молекулярно-генетических и серологических методов диагностики. Только при таком условии можно достоверно отслеживать частоту встречаемости *M. pneumoniae* как возбудителя ВП. Необходимым является анализ встречаемости микоплазмы на протяжении года, а также иммунного статуса к *M. pneumoniae*. Перспективой дальнейшего изучения является исследование сочетания серологического и молекулярно-генетического методов исследования *M. pneumoniae* на территории Луганской Народной Республики.

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.

Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациентов или их родителей либо законных представителей.

Informed consent

In carrying out the study, written informed consent was obtained from all patients or their parents or legal representatives.

Литература / References

1. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. Bull World Health Organ. 2008 May;86(5):408-16. DOI: 10.2471/blt.07.048769
2. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct;17(4):697-728, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.697-728.2004
3. Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the Respiratory Tract and Beyond. Clin Microbiol Rev. 2017 Jul;30(3):747-809. DOI: 10.1128/CMR.00114-16
4. Medjo B, Atanaskovic-Markovic M, Radic S, Nikolic D, Lukac M, Djukic S. *Mycoplasma pneumoniae* as a causative agent of community-acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis. Ital J Pediatr. 2014 Dec 18;40:104. DOI: 10.1186/s13052-014-0104-4
5. Layani-Milon MP, Gras I, Valette M, Luciani J, Stagnara J, Aymard M, et al. Incidence of upper respiratory tract *Mycoplasma pneumoniae* infections among outpatients in Rhône-Alpes, France, during five successive winter periods. J Clin Microbiol. 1999 Jun;37(6):1721-6. DOI: 10.1128/JCM.37.6.1721-1726.1999
6. Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. Thorax. 2011 Oct;66 Suppl 2:ii1-23. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2011-200598
7. Bébér C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. Future Microbiol. 2011 Apr;6(4):423-31. DOI: 10.2217/fmb.11.18

8. Okada T, Morozumi M, Tajima T, Hasegawa M, Sakata H, Ohnari S, et al. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. *Clin Infect Dis*. 2012 Dec;55(12):1642-9. DOI: 10.1093/cid/cis784
9. Zhao F, Liu G, Wu J, Cao B, Tao X, He L, et al. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Mar;57(3):1521-3. DOI: 10.1128/AAC.02060-12
10. Wu PS, Chang LY, Lin HC, Chi H, Hsieh YC, Huang YC, et al. Epidemiology and clinical manifestations of children with macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Taiwan. *Pediatr Pulmonol*. 2013 Sep;48(9):904-11. DOI: 10.1002/ppul.22706
11. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2003 Nov;41(11):4915-23. DOI: 10.1128/JCM.41.11.4915-4923.2003
12. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Nov;32(6):956-73. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00129.x
13. Zhang L, Zong ZY, Liu YB, Ye H, Lv XJ. PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: a systematic review & meta-analysis. *Indian J Med Res*. 2011 Sep;134(3):270-80.
14. Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol*. 2008 Dec;3(6):635-48. DOI: 10.2217/17460913.3.6.635
15. Spuesens EB, Fraaij PL, Visser EG, Hoogenboezem T, Hop WC, van Adrichem LN, et al. Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. *PLoS Med*. 2013;10(5):e1001444. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001444
16. Wood PR, Hill VL, Burks ML, Peters JI, Singh H, Kannan TR, et al. *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute and refractory asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 May;110(5):328-334.e1. DOI: 10.1016/j.anaai.2013.01.022. Epub 2013 Feb 23. Erratum in: *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Oct;111(4):309.
17. Centor RM, Atkinson TP, Ratliff AE, Xiao L, Crabb DM, Estrada CA, et al. The clinical presentation of *Fusobacterium*-positive and streptococcal-positive pharyngitis in a university health clinic: a cross-sectional study. *Ann Intern Med*. 2015 Feb 17;162(4):241-7. DOI: 10.7326/M14-1305
18. Chang HY, Chang LY, Shao PL, Lee PI, Chen JM, Lee CY, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological tests for the confirmation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Apr;47(2):137-44. DOI: 10.1016/j.jmii.2013.03.015
19. Diaz MH, Winchell JM. The Evolution of Advanced Molecular Diagnostics for the Detection and Characterization of *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2016 Mar 8;7:232. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00232

Информация об соавторах:

Бондаренко Виктория Викторовна, главный внештатный специалист по медицинской микробиологии Министерства здравоохранения Луганской Народной Республики, заведующая клинико-диагностической лабораторией Луганской республиканской детской клинической больницы

Хохлова Александра Викторовна, аспирант кафедры лабораторной диагностики, анатомии и физиологии Луганского государственного педагогического университета

Information about authors:

Victoria V. Bondarenko, chief freelance specialist in medical microbiology of the Ministry of Health of the Lugansk People's Republic, head of the clinical diagnostic laboratory, Lugansk Republican Children's Clinical Hospital

Alexandra V. Khokhlova, postgraduate student of the Department of Laboratory Diagnostics, Anatomy and Physiology of the Lugansk State Pedagogical University

НОВОСТИ НАУКИ

Туберкулез под водой: микроб морской губки проливает свет на эволюцию бактерии

Реконструкция эволюционного происхождения *Mycobacterium tuberculosis*, возбудителя туберкулеза человека, помогла выявить бактериальные факторы, которые привели к тому, что туберкулезная палочка стала грозным патогеном человека. Сообщается об открытии и подробной характеристике чрезвычайно медленно растущей микобактерии, которая тесно связана с *M. tuberculosis*, для которой предложено видовое название *Mycobacterium spongiae* sp. nov., (идентификатор штамма: FSD4b-SM). Бактерия была выделена из морской губки, взятой из вод Большого Барьерного рифа в Квинсленде, Австралия. Сравнительная геномика показала, что после оппортунистического патогена человека *Mycobacterium decipiens*, *M. spongiae* является наиболее близкородственным видом к комплексу *M. tuberculosis*, о котором сообщалось на сегодняшний день, с 80% общей средней нуклеотидной идентичностью и обширным сохранением ключевых факторов вирулентности *M. tuberculosis*, включая неповрежденные системы секреции ESX и связанные с ними эффекторы. Протеомный и липидомный анализы показали, что эти консервативные системы функциональны в FSD4b-SM, но он также производит липиды клеточной стенки, ранее не описанные в микобактериях. Мы исследовали потенциал вирулентности FSD4b-SM у мышей и обнаружили, что, хотя бактерии сохраняются в легких в течение 56 дней после интраназального заражения, явной патологии обнаружено не было. Сходство с *M. tuberculosis*, а также отсутствие вирулентности побудили исследовать потенциал FSD4b-SM как вакцинного штамма и как генетического донора генетического локуса ESX-1 для улучшения иммуногенности БЦЖ. Однако ни один из этих подходов не привел к лучшей защите от заражения *M. tuberculosis* по сравнению с вакцинацией БЦЖ в отдельности. Открытие *M. spongiae* дополняет наше понимание возникновения комплекса *M. tuberculosis* и станет еще одним полезным ресурсом для уточнения нашего понимания факторов, которые сформировали эволюцию и патогенез *M. tuberculosis*.

Pidot SJ, Klatt S, Ates LS, Frigui W, Sayes F, Majlessi L, et al. Marine sponge microbe provides insights into evolution and virulence of the tubercle bacillus. *PLoS Pathog*. 2024 Aug 29;20(8):e1012440. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012440

Изучение протективных свойств химерного белка OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* на моделях синегнойной инфекции у мышей

В.С.Тимофеев, Т.Б.Кравченко, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Ю.О.Гончарова,
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова

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

Pseudomonas aeruginosa – синегнойная палочка – является одним из наиболее опасных оппортунистических патогенов и причиной внутрибольничных пневмоний, раневых и ожоговых инфекций и ко-инфекций при COVID-19. *P. aeruginosa* обладает большим количеством факторов вирулентности и способна быстро приспосабливаться к новым условиям. Выявляется большое количество штаммов с множественной устойчивостью к антибиотикам. Помочь решить проблему возникновения синегнойной инфекции может вакцинация, однако в настоящее время не зарегистрировано ни одной доступной вакцины.

Целью данного исследования является разработка кандидатной субъединичной вакцины против *P. aeruginosa* на основе химерного рекомбинантного белка OprF/OprL, состоящего из двух слитых мембранных белков. Полноразмерные гены *oprF* и *oprL* были слиты и клонированы в экспрессионный вектор с получением плазмиды pLATE51-*oprF/oprL*. Химерный белок OprF/OprL получен путем экспрессии и очищен методом аффинной металл-хелатирующей хроматографии. Моделирование синегнойной инфекции осуществлено на двух животных моделях мышей линии Swiss Webster с индуцированным иммунодефицитом, иммунизированных белком OprF/OprL: модели летального синегнойного сепсиса и модели синегнойной инфекции мягких тканей бедра. У всех иммунизированных животных иммуноферментный анализ показал высокий титр специфических антител к OprF/OprL, который составлял ~1:100000. Достоверной разницы при оценке обсемененности крови между иммунными и контрольными животными как с перитонитом, так и с инфекцией бедра не было выявлено. Оценка протективности OprF/OprL иммунизированных мышей при заражении штаммом *P. aeruginosa* PAO-1 дозой 5 LD₅₀ показала, что иммунизация предохраняла от гибели 33% животных и при синегнойном сепсисе, и при инфекции бедра. Таким образом, мы предлагаем кандидатную субъединичную вакцину, основой которой является гибридный белок OprF/OprL, состоящий из полноразмерных слитых иммуногенных белков OprF и OprL *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, синегнойная инфекция, животные модели, субъединичная вакцина, OprF, OprL

Для цитирования: Тимофеев В.С., Кравченко Т.Б., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И. Изучение протективных свойств химерного белка OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* на моделях синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2024; 9(4): 100–106. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-100-106

The study of the protective properties of the chimeric protein OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* on mice models

V.S.Timofeev, T.B.Kravchenko, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, Yu.O.Goncharova,
A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova

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

Pseudomonas aeruginosa – is one of the most dangerous opportunistic pathogens and the cause of nosocomial pneumonia, wound and burn infections and coinfections in COVID-19. *P. aeruginosa* has a large number of virulence factors and is able to quickly adapt to new conditions. A large number of strains with multiple antibiotic resistance are being identified. Vaccination can help solve the problem of *P. aeruginosa* infection, but currently no available vaccine has been registered.

The aim of this study is to develop a candidate subunit vaccine against *P. aeruginosa* based on the chimeric recombinant protein OprF/OprL, consisting of two fused membrane proteins. The full-size genes *oprF* and *oprL* were fused and cloned into an expression vector to produce the pLATE51-*oprF/oprL* plasmid. The chimeric OprF/OprL protein was obtained by expression and purified by affinity metal chelating chromatography. *P. aeruginosa* infection was modeled on two animal models of mice Swiss Webster with induced immunodeficiency immunized with OprF/OprL protein: model of lethal sepsis and model of infection

Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, заместитель директора по аналитической работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 11.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Vitaly S. Timofeev, PhD (Biological Sciences), Deputy Director for Analytical Work, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

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

The article was received 11.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

of the thigh soft tissues. In all immunized animals enzyme immunoassay showed a high titer of specific antibodies to OprF/OprL, which was ~1/100000. There was no significant difference in the assessment of blood contamination between immune and control animals with both peritonitis and thigh infection. Evaluation of the OprF/OprL protectivity of immunized mice infected with the *P. aeruginosa* PAO-1 at a dose of 5 LD₅₀ showed that immunization prevented 33% of animals with both peritonitis and thigh infection from dying. Thus, we propose a candidate subunit vaccine based on the hybrid protein OprF/OprL, consisting of full-size fused immunogenic proteins OprF and OprL of *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, animal models, subunit vaccine, OprF, OprL

For citation: Timofeev V.S., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Goncharova Yu.O., Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I. The study of the protective properties of the chimeric protein OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* on mice models. *Bacteriology*. 2024; 9(4): 100–106. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-100-106

Pseudomonas aeruginosa – синегнойная палочка, грамотрицательный аэробный микроорганизм, обитающий в воде и почве, являющийся условно-патогенным из-за способности вызывать оппортунистические инфекции. Свое название он получил из-за характерного сине-зеленого цвета гнойных выделений и окрашивания перевязочного материала ожоговых ран при внутрибольничных заражениях.

Синегнойная палочка входит в число наиболее актуальных возбудителей оппортунистических инфекций. Свое место она по праву заняла в эру множественной антибиотикорезистентности. Этим микроорганизмом обусловлено 16% случаев внутрибольничных пневмоний, от 8 до 12% внутрибольничных инфекций и инфекций хирургических ран [1], также отмечаются вспышки в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных [2]. Используя свой арсенал факторов вирулентности и способность адаптироваться к новым условиям, *P. aeruginosa* вызывает ряд трудно поддающихся лечению острых и хронических инфекций у лиц с ослабленным иммунитетом. Синегнойная палочка может инфицировать и колонизировать почти все системы органов человека. Заболевания варьируют от легких местных инфекций до опасных для жизни инфекций ожоговых ран, бактериемии и пневмонии. Кроме того, вызываемые *P. aeruginosa* заболевания являются второй наиболее распространенной бактериальной ко-инфекцией у пациентов с COVID-19 [3].

Всемирная организация здравоохранения определила *P. aeruginosa* как один из патогенов, требующих срочных поисков новых методов лечения [4]. Главная проблема заключается в том, что, наряду с *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* является одним из видов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), объединенных в группу ESKAPE-патогенов [5]. Сложность терапии, в особенности антибиотикотерапии, и высокая летальность определяют актуальность разработки альтернативных методов предотвращения и лечения инфекций *P. aeruginosa*. В связи со все более частым обнаружением штаммов *P. aeruginosa*, обладающих МЛУ, мы приближаемся ко времени, когда не останется никаких методов лечения этой инфекции. Таким образом, необходимы новые профилактические и терапевтические стратегии. Вакцины являются многообещающей альтернативой антибиотикам, помогающей предотвратить инфицирование *P. aeruginosa* восприимчивыми людьми. К сожалению, несмотря на обширные исследования, в настоящее время нет доступных лицензированных

вакцин против инфекций, вызываемых этим патогеном [3]. Однако клиническая значимость *P. aeruginosa* обусловила большое количество научных изысканий по разработке вакцинных препаратов для специфической профилактики. Ряд исследований посвящен изучению иммунологической активности целого ряда белков *P. aeruginosa*, в т.ч. OprL (outer membrane protein L – пептидогликан-ассоциированный липопротеин) и OprF (outer membrane protein F – порин внешней мембраны), рассматриваемые в качестве компонентов потенциальной субъединичной псевдомонадной вакцины [6].

Целью данного исследования является разработка кандидатной субъединичной вакцины против *P. aeruginosa* на основе химерного рекомбинантного белка OprF/OprL, состоящего из двух слитых мембранных белков.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования. Термолизат культуры штамма *P. aeruginosa* PAO-1 (кат. № В-168 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск») использовали как источник ДНК при амплификации целевых генов методом полимеразной цепной реакции. Этот же штамм использовали для моделирования синегнойной инфекции. Для клонирования генов использовали штамм *Escherichia coli* DH5α, для экспрессии рекомбинантного белка – *E. coli* BL21(DE3). Для культивирования *P. aeruginosa* использовали ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), для *E. coli* – агар Хоттингера и бульон Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), для рекомбинантных штаммов *E. coli* добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, для высевов из органов животных была использована селективная среда для *P. aeruginosa* – цетримидный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Лабораторные животные. В качестве модельных животных использовали аутбредных мышей Swiss Webster (самцы/самки, 28–32 г), выращенных в питомнике ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ОО «Лабораторкорм», Россия). Животных размещали в клетках группами не более шести особей и проводили ежедневное ветеринарное наблюдение.

Получение генетических конструкций. Для получения генетических конструкций нами были сконструированы праймеры и синтезированы ОО «НПФ СИНТОЛ» (Россия). Гены *oprF* и *oprL*, кодирующие белки OprF и OprL *P. aeruginosa*, были амплифицированы с использованием праймеров

OprFF1 5'-GATGACAAGATGAACTGAAGAACACCTT-3' и
OprFR1 5'-CATTTCCATCTTGGCTTCAGCTTCTAC-3';
OprLF1 5'-GAAGCCAAGATGGAAATGCTGAAATTC-3' и
OprLR1 5'-AAGTCATTATTACTTCTTCAGCTCGACGC-3' со-
ответственно. Слияние амплифицированных фрагментов
осуществляли с использованием набора Gibson Assembly
Cloning Kit (New England Biolabs, США). Гибридный фрагмент
клонировали в вектор pJET1.2/blunt с использованием на-
бора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific,
США). Конструкцию pJET1.2/blunt-oprF/oprL трансформиро-
вали в штамм *E. coli* DH5 α путем электропорации. Затем
проводили амплификацию гибридного фрагмента oprF/oprL
с использованием праймеров

OprFF2 5'-GGTGATGATGATGACAAGATGAACTGAAG-3' и
OprLR2 5'-GGAGATGGGAAGTCATTATTACTTCTTCAGC-3'.

В качестве источника матрицы ДНК была использована
плазмида pJET1.2/blunt-oprF/oprL. Полученный фрагмент
клонировали в экспрессионный вектор pLATE51 с использо-
ванием набора aLICator Ligation Independent Cloning and
Expression System (Thermo Fisher Scientific, США).
Конструкцию pLATE51-oprF/oprL трансформировали в
штамм *E. coli* DH5 α путем электропорации. Плазмида была
выделена с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0
(«Евроген», Россия) и трансформирована в экспрессионный
штамм *E. coli* BL21(DE3).

Получение и очистка рекомбинантного белка. Синтез
целевого белка штаммом *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-oprF/
oprL индуцировали внесением индуктора изопропил- β -D-1-
тиогалактопиранозид в конечной концентрации 2 мМ с
последующей инкубацией в течение 3,5 ч при 37°C. Целевой
белок выделяли из телец включения солюбилизацией бу-
фером (5 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис, pH 7,9)
с добавлением мочевины до конечной концентрации 6 М с
последующей аффинной хроматографией на колонке с 5
мл хелатирующего сорбента Ni⁺⁺-NTA-Сефароза (GE
Healthcare, Швеция). Белок элюировали возрастающими
концентрациями имидазола в диапазоне 20–500 мМ. После
электрофоретического анализа в 10%-м ПААГ-SDS фрак-
ции, содержащие целевой белок, объединяли и диализова-
ли при температуре 6°C против буфера (20 мМ Трис, pH
7,4). Концентрацию белка определяли при $\lambda = 280$ нм на
спектрофотометре Ultrospec 3100 pro (Pharmacia Biotech,
США).

Адсорбция белка на гидроксид алюминия. Препарат
очищенного белка OprF/OprL диализовали против забуф-
ренного физиологического раствора (10 мМ Na₃PO₄, 137 мМ
NaCl, pH 7,2–7,4) (ЗФР) и стерилизовали через мембранный
фильтр 0,20 мкм Filtrapor S 0.2 (Sarsted Ag&Co.KG, Германия).
Взвесь, содержащую 50% Al(OH)₃ в ЗФР, стерилизовали и
осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение
15 мин. После удаления жидкой фазы вносили препарат
белка в соотношении 1 мг белка на 200 мг Al(OH)₃.
Полученную суспензию перемешивали при комнатной тем-
пературе на роторном шейкере Multi Bio RS-24 (BioSan,
Латвия) в течение 2 ч, далее без перемешивания в течение
16 ч при температуре +4°C. Не связавшийся с Al(OH)₃ белок
отделяли центрифугированием и проводили контроль ад-
сорбции спектрофотометрическим и электрофоретическим
анализом в 10%-м ПААГ-SDS. Взвесь Al(OH)₃ с адсорбиро-

ванным белком дважды промывали ЗФР. На последнем
этапе осадок суспендировали в рассчитанном количестве
ЗФР, с добавлением консерванта мертиолята натрия до ко-
нечной концентрации 100 мкг/мл.

Иммунизация. Мыши ($n = 30$) были иммунизированы бел-
ком OprF/OprL, сорбированным на Al(OH)₃. Иммунизация
проводилась подкожно в дозе 50 мкг/мышь двукратно с ин-
тервалом 21 день. В контрольную группу ($n = 16$) вошли не-
иммунные мыши той же партии животных. Через 14 дней
после последней иммунизации мыши были заражены штам-
мом PAO-1.

Определение титра антител в крови животных проводили
иммуноферментным анализом согласно руководству Т.Т.Нго
и др. [7]. В качестве антигена использовали OprF/OprL, сор-
бированный в концентрации 1 мкг/мл. Адсорбцию проводили
в течение ночи при температуре 4°C, инактивацию свобод-
ных центров связывания – при температуре 37°C в течение
30 мин раствором 1% БСА. Забор крови у иммунизирован-
ных животных осуществляли прижизненно через 14 дней
после второй иммунизации. Полученные из проб крови сы-
воротки использовали в исходном разведении 1:20, титрова-
ли далее с шагом 1:2 и инкубировали в течение 1 ч при
температуре 37°C. После отмывки в лунки вносили раствор
конъюгата антимишинных антител с пероксидазой хрена
(Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении 1:12 000 и инку-
бировали в течение 1 ч при температуре 37°C. Окрашивание
проводили раствором ортофенилендиамина. Оптическую
плотность (ОП) в лунках измеряли при $\lambda = 492$ нм на спек-
трофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США).
За конечный титр принимали разведение, ОП которого в
2 раза превышала ОП в контрольной лунке. За контрольные
принимали лунки с сывороткой интактных животных в ис-
ходном разведении 1:20.

Моделирование синегнойной инфекции проводили на
мышях с индуцированным иммунодефицитом на моделях
летального синегнойного сепсиса и синегнойной инфекции
мягких тканей бедра, как описано ранее в [8]. В эксперимен-
тальных группах было по 15 иммунизированных мышей, в
контрольных – по 8 неиммунных. Для моделирования леталь-
ного синегнойного сепсиса у мышей индуцировали перитонит.
В качестве иммунодепрессанта использовали муцин.
Для этого ночную культуру PAO-1 суспендировали в ЗФР с
2,5%-м муцином. Заражение проводили внутрибрюшинно в
дозе 5 LD₅₀ (10⁶ КОЕ/мышь). Бедренную синегнойную инфек-
цию воспроизводили на мышях с индуцированным иммуно-
дефицитом, вызванным циклофосфамидом: животным
дважды (за 4 суток и за сутки до заражения) внутрибрюшин-
но вводили циклофосфамид в дозе 100 мг/кг. Ночную куль-
туру PAO-1, суспендированную в ЗФР, вводили внутримы-
шечно в дозе 10⁶ КОЕ/мышь.

Бактериологический анализ биологических образцов.
Через 12 ч после заражения часть животных гуманно эвта-
назировали ингаляцией CO₂ и получали у них селезенку и
образцы крови пункцией сердца. Образцы крови смешивали
с 3,7%-м цитратом натрия в соотношении 3:1, селезенку го-
могенизировали в 1 мл ЗФР. Количество высеваемых бакте-
рий оценивали путем высевов цельных образцов и их деся-
тикратных разведений, которые инкубировали при темпера-
туре 37°C в течение 24 ч.

Результаты исследования и их обсуждение

Как известно, синегнойная инфекция является значимой проблемой здравоохранения из-за все большего количества штаммов, обладающих МЛУ, и одним из основных видов микроорганизмов, обуславливающих внутрибольничные заражения. Кроме внутрибольничных пневмоний, инфекций новорожденных, эндофтальмитов, синдрома «зеленого ногтя» и заражений людей с ослабленным иммунитетом, актуальность опасений по поводу *P. aeruginosa* возрастает из-за того, что он зачастую вызывает вторичную бактериальную инфекцию у больных с COVID-19 [3] и крайне опасен при раневых заражениях и ожогах. В связи с появлением у штаммов *P. aeruginosa* устойчивости ко все большему количеству антибактериальных препаратов требуются новые средства борьбы с ним. К таким средствам относится вакцинопрофилактика. Однако в настоящее время не существует доступных вакцин против инфекций, вызываемых этим патогеном, в т.ч. и отечественного производства.

В рамках федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» мы занялись поиском кандидата потенциальной субъединичной псевдомонадной вакцины. На первом этапе осуществили поиск белков-кандидатов. В поле нашего внимания попали белки OprF и OprL. OprF – это порин внешней мембраны *P. aeruginosa*, высококонсервативный среди различных штаммов. Он является одним из основных антигенов и играет важную роль в вирулентности: участвует в определении кворума, секреции токсинов и клеточной адгезии [9, 10]. OprF имеет N-концевой пориновый домен и C-концевой пептидогликан-связывающий домен [11]. Ранее этот белок уже стал популярным кандидатом-антигеном для вакцин против синегнойной палочки, однако авторы работ зачастую предлагают использовать только C- либо N-концевой домен белка [10]. OprL – пептидогликан-ассоциированный липопротеин внешней мембраны [12]. Известно, что рекомбинантный OprL способен вызывать сильный Th17-ответ, который обеспечивает Th17-зависимую и серотип-независимую защиту от острой легочной инфекции *P. aeruginosa* у мышей [13]. Именно поэтому эти белки были выбраны нами в качестве целевых. А чтобы увеличить количество иммуногенных эпитопов и упростить процесс оптимизации получения кандидатной вакцины, мы решили получить химерный белок путем слияния генов *oprF* и *oprL* с помощью стандартных генно-инженерных процедур.

Полноразмерные последовательности *oprF* и *oprL* были объединены нами по методу Гибсона и клонированы в экспрессионный вектор pLATE51, в результате чего была получена целевая генетическая конструкция pLATE51-*oprF/oprL*. Согласно расчетам, *in silico* размер последовательности слитых генов составил 1557 п.н., а размер экспрессируемого гибридного белка OprF/OprL в совокупности с сигнальным пептидом плазмиды pLATE51 – 548 а.о. Плазмида pLATE51-*oprF/oprL* была трансформирована в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

В результате индукции синтеза белка из телец включения штамма *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-*oprF/oprL* был получен препарат частично очищенного рекомбинантного химерного белка OprF/OprL. Отдельные этапы аффинной металл-хела-

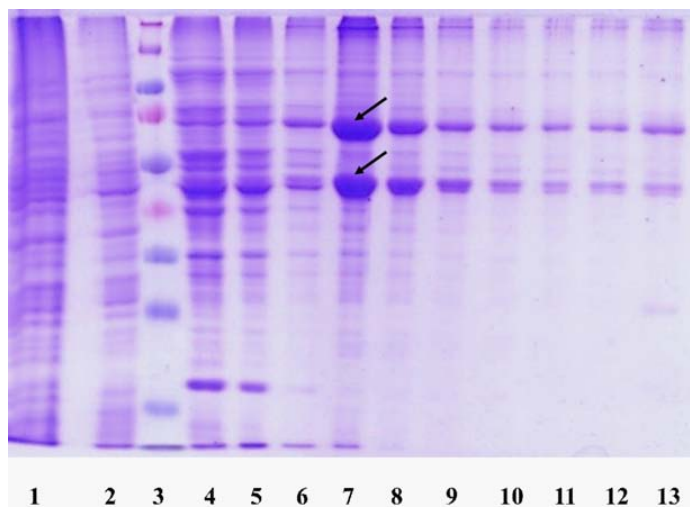


Рис. 1. Электрофореграмма хроматографических фракций, полученных при выделении химерного белка OprF/OprL из клеток *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-*oprF/oprL* аффинной хроматографией на Ni⁺⁺-NTA-Сефарозе (GE Healthcare, Швеция): 1 – клеточный осадок, солюбилизованный в 6 М мочеvine; 2 – фракция, элюированная промывкой колонки стартовым буфером; 3 – маркер молекулярных масс Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 4–6 – фракции, элюированные 20 мМ имидазола; 7–12 – фракции, элюированные промывкой колонки 60 мМ имидазола; 13 – фракция, элюированная промывкой колонки 500 мМ имидазола. Целевой белок показан стрелкой.

Fig. 1. Electropherogram of chromatographic fractions obtained during isolation of OprF/OprL chimeric protein from *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-*oprF/oprL* cells by affinity chromatography on Ni⁺⁺-NTA-Sephacrose (GE Healthcare, Sweden): 1 – cell pellet solubilized in 6 M urea; 2 – fraction eluted by washing the column with starting buffer; 3 – molecular weight marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); 4–6 – fractions eluted with 20 mM imidazole; 7–12 – fractions eluted by washing the column with 60 mM imidazole; 13 – fraction eluted by washing the column with 500 mM imidazole. The target protein is shown by an arrow.

тирующей хроматографии в денатурирующих условия отражены на рис. 1, где представлены результаты электрофоретического анализа различных фракций, элюированных с сорбента (целевой белок показан стрелкой).

Элюция белка проходила в широком диапазоне концентраций имидазола (20–500 мМ). Поскольку во фракциях элюции присутствовали две мажорных полосы: одна с кажущейся молекулярной массой $65,6 \pm 0,23$ кДа, превышающей значение рассчитанной молекулярной массы химерного белка OprF/OprL, равной 58,7 кДа (548 а.о., pI 5,53), и вторая с кажущейся молекулярной массой $45,7 \pm 0,07$ кДа, то для проведения дальнейших этапов очистки объединенная фракция была ренатурирована диализом против буфера (5 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис, pH 7,9) для проведения повторного хроматографического разделения на сорбенте Ni⁺⁺-NTA-Сефарозе в неденатурирующих условиях. Элюированный препарат также содержал две мажорные белковые полосы, аналогичные по параметрам электрофоретической подвижности первоначальной фракции, что свидетельствует о наличии в белке с меньшей молекулярной массой последовательности из шести остатков гистидина. Примечательно, что молекулярная масса меньшей формы белка отличается от исходной на ~20 кДа, а молекулярная масса второго в последова-



Рис. 2. Электрофореграмма объединенной фракции очищенного белка OprF/OprL: 1 – маркер молекулярных масс Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 2 – препарат очищенного ренатурированного OprF/OprL.

Fig. 2. Electropherogram of the combined fraction of purified OprF/OprL protein: 1 – molecular weight marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); 2 – preparation of purified renatured OprF/OprL.

тельности белка OprL близка по значению к разнице между формами и составляет ~17 кДа. Это может свидетельствовать о вероятном протеолитическом отщеплении OprL от молекулы OprF/OprL и существовании в препарате белковой формы OprF с лидерной последовательностью pLATE51 с кажущейся молекулярной массой 45,7 кДа, близкой к расчетной 51 кДа.

После ренатурации степень чистоты суммарного белка с учетом присутствия двух молекулярных форм составила ~80% (рис. 2), а полученный белок был сорбирован на Al(OH)₃.

Очищенный и сорбированный на Al(OH)₃ белок был использован для двукратной иммунизации аутбредных мышей Swiss Webster. Через 14 дней после второй иммунизации у мышей проводили прижизненный забор крови для определения титра антител. Было показано, что у всех иммунизированных животных был индуцирован высокий титр специфических антител к химерному белку OprF/OprL, который составлял ~1/100 000.

Главная задача работы заключалась в том, чтобы показать, что полученный нами белок, являющийся основой предлагаемой нами кандидатной вакцины против синегнойной инфекции, способен оказывать протективное действие.

Ввиду невозможности моделирования инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, на иммунокомпетентных животных мы использовали модели летального синегнойного сепсиса (перитонита) и синегнойной инфекции мягких тканей бедра у мышей с индуцированным иммунодефицитом, предваритель-

но иммунизированных белком OprF/OprL, как описано в ранее [4]. После двукратной иммунизации OprF/OprL, введения иммунодепрессанта и заражения штаммом PAO-1 (5 LD₅₀) за животными осуществлялось тщательное ветеринарное наблюдение в течение нескольких дней. Бактериологический анализ крови у зараженных PAO-1 иммунизированных и контрольных мышей проводили через 12 ч, при этом все животные к этому сроку были живы. Анализ показал, что обсемененность крови у животных с перитонитом составляла (M ± SD): 7,3 ± 7 КОЕ/мл у иммунных и 56,7 ± 57,1 КОЕ/мл у контрольных, а у животных с синегнойной инфекцией бедра – 200,8 ± 186,4 КОЕ/мл и 366,7 ± 230,9 КОЕ/мл соответственно. Однако достоверной разницы между группами иммунных и контрольных животных не было выявлено.

Однако важно подчеркнуть, что иммунизация предохраняла от гибели при последующем заражении по 5 животных из 15 в обеих экспериментальных группах (рис. 3). Таким образом, оценка протективных свойств гибридного белка OprF/OprL при заражении мышей штаммом *P. aeruginosa* PAO-1 дозой 5 LD₅₀ показала, что иммунизация предохраняла от гибели 33% животных как при синегнойном сепсисе, так и при синегнойной инфекции мягких тканей бедра. При расчете достоверности в программе GraphPad Prism с использованием непараметрического обобщенного теста Гехана–Бреслоу–Вилкоксона уровень значимости различий между опытными и контрольными группами мышей *p* был равен 0,06 и 0,03 при перитоните и инфекции бедра соответственно.

Заключение

Таким образом, в данной работе нами изучен протективный потенциал кандидатной субъединичной вакцины против инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, основой которой является гибридный белок, состоящий из слитых иммуногенных белков OprF и OprL. Мы можем констатировать, что субъединичные вакцинные препараты могут быть достаточно полезными для защиты от синегнойной инфекции, учитывая высокую степень МЛУ *P. aeruginosa*.

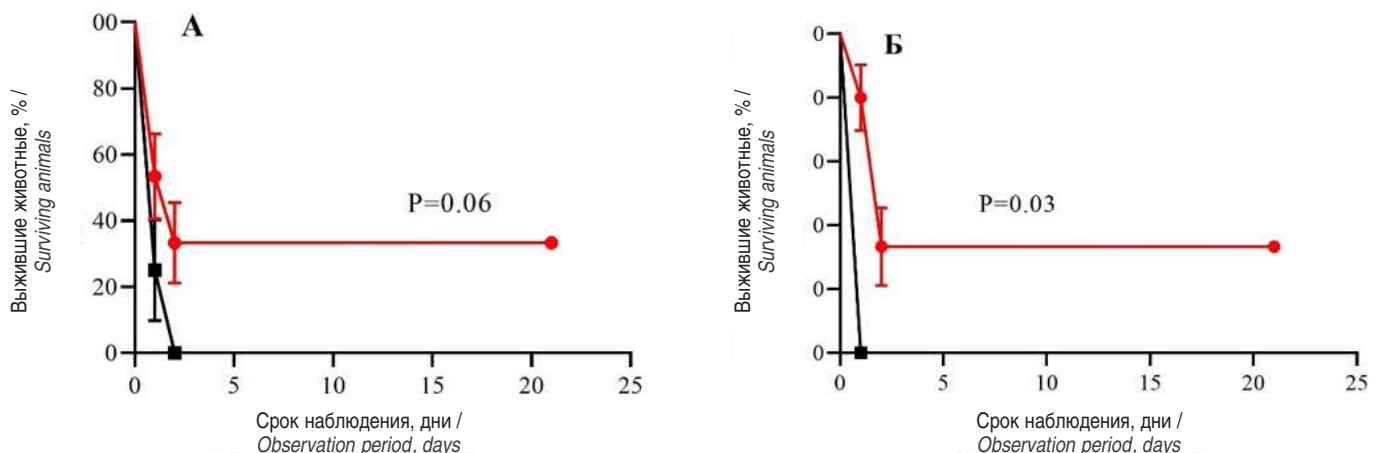


Рис. 3. Выживаемость мышей, иммунизированных химерным рекомбинантным белком OprF/OprL, после заражения штаммом *P. aeruginosa* PAO-1 при экспериментальной синегнойной инфекции. А – синегнойный перитонит; Б – бедренная синегнойная инфекция. ■ – контрольные мыши, ● – иммунные мыши.

Fig. 3. Survival of mice immunized with the chimeric recombinant protein OprF/OprL after infection with the *P. aeruginosa* strain PAO-1 during experimental *P. aeruginosa* peritonitis; B – femoral *P. aeruginosa* infection. ■ – control mice, ● – immune mice.

Информация о финансировании

Работа поддержана проектом «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Financial support

The work is supported by the project “Sanitary shield of the country – safety for health (prevention, detection, response)”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Егорова ОН, Брусина ЕБ, Григорьев ЕВ. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НП «НАСКИ»), 2014.
2. Маркович НИ, Сергеевни ВИ, Сармометов ЕВ, Кузнецова МВ, Карпунина ТИ, Авдеева НС, и др. Вспышка синегнойной инфекции среди новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010;52(3):5-10.
3. Killough M, Rodgers AM, Ingram RJ. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. *Vaccines*. 2022;10:1100. DOI: 10.3390/vaccines10071100.
4. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
5. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol*. 2019 Apr 1;10:539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539
6. Калашин АА, Леонова ЕИ, Солдатенкова АВ, Михайлова НА. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016;71(1):5-10. DOI: 10.15690/vramn584
7. Нго ТТ, Ленххофф ГМ, Яклич А, и др. Иммуноферментный анализ: научное издание. Пер. с англ. Калугера СВ, Остермана АЛ. Под ред. Егорова АМ. М.: Изд-во Мир, 1988.
8. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВП, Веревкин ВВ, и др. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
9. Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1176-86. DOI: 10.1128/IAI.00850-10
10. Bahey-El-Din M, Mohamed SA, Sheweita SA, Haroun M, Zaghoul TI. Recombinant N-terminal outer membrane porin (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* is a promising vaccine candidate against both *P. aeruginosa* and some strains of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Med Microbiol*. 2020 Apr;310(3):151415. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151415
11. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Sep 1;41(5):698-722. DOI: 10.1093/femsrev/fux020. PMID: 28981745
12. Lim A, De Vos D, Brauns M, Mossialos D, Gaballa A, Qing D, et al. Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*. 1997 May;143 (Pt 5):1709-1716. DOI: 10.1099/00221287-143-5-1709

associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*. 1997 May;143 (Pt 5):1709-1716. DOI: 10.1099/00221287-143-5-1709

13. Gao C, Yang F, Wang Y, Liao Y, Zhang J, Zeng H, et al. Vaccination with a recombinant OprL fragment induces a Th17 response and confers serotype-independent protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Clin Immunol*. 2017 Oct;183:354-363. DOI: 10.1016/j.clim.2017.09.022

References

1. Egorova ON, Brusina EB, Grigor'ev EV. Epidemiologiya i profilaktika sinegnoinoi infektsii. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. M.: Natsional'naya assotsiatsiya spetsialistov po kontrolyu infektsii, svyazannykh s okazaniem meditsinskoj pomoshchi (NP «NASKI»), 2014 (In Russian).
2. Markovich NI, Sergevni VI, Sarmometov EV, Kuznetsova MV, Karpunina TI, Avdeeva NS, et al. Outbreak of Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Department for Newborns. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2010;52(3):5-10. (In Russian).
3. Killough M, Rodgers AM, Ingram RJ. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. *Vaccines*. 2022;10:1100. DOI: 10.3390/vaccines10071100.
4. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
5. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol*. 2019 Apr 1;10:539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539
6. Kaloshin AA, Leonova EI, Soldatenkova AV, Mihailova NA. Assessment Protective Properties of the Recombinant Complex of the Outer Membrane Protein F and the Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(1):5-10. DOI: 10.15690/vramn584 (In Russian).
7. Ngo TT, Lenkhoff GM, Yaklich A. i dr. Immuofermentnyi analiz: nauchnoe izdanie. Per. s angl. Kalugera SV, Ostermana AL. Pod red. Egorova AM. M.: Publ. Mir, 1988. (In Russian).
8. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. *Bacteriology*. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
9. Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1176-86. DOI: 10.1128/IAI.00850-10
10. Bahey-El-Din M, Mohamed SA, Sheweita SA, Haroun M, Zaghoul TI. Recombinant N-terminal outer membrane porin (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* is a promising vaccine candidate against both *P. aeruginosa* and some strains of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Med Microbiol*. 2020 Apr;310(3):151415. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151415
11. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Sep 1;41(5):698-722. DOI: 10.1093/femsrev/fux020. PMID: 28981745
12. Lim A, De Vos D, Brauns M, Mossialos D, Gaballa A, Qing D, et al. Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*. 1997 May;143 (Pt 5):1709-1716. DOI: 10.1099/00221287-143-5-1709
13. Gao C, Yang F, Wang Y, Liao Y, Zhang J, Zeng H, et al. Vaccination with a recombinant OprL fragment induces a Th17 response and confers serotype-independent protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Clin Immunol*. 2017 Oct;183:354-363. DOI: 10.1016/j.clim.2017.09.022

Информация об соавторах:

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

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Гончарова Юлия Олеговна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

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

Information about authors:

Tatiana B. Kravchenko, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Irina V. Bakhteeva, MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Galina M. Titareva, MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Yulia O. Goncharova, PhD in Biological Sciences, Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

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

Olga V. Korobova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Tatiana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Псевдомонады противодействуют иммунитету, нарушая выработку энергии в макрофагах

Исследователи обнаружили, что бактерия *Pseudomonas aeruginosa* выделяют химическое вещество, которое подавляет выработку энергии в митохондриях макрофагов, тем самым ослабляя иммунный ответ.

2-аминоацетофенон (2-АА), является полезным биомаркером инфекций *Pseudomonas* в клинике, но макрофаги не поглощают и не утилизируют *P. aeruginosa* – энергоемкий процесс – в присутствии 2-АА. В опытах *in vitro* помощью флуоресцентного зонда было показано, что потребление кислорода снизилось в клетках, подвергшихся воздействию 2-АА, что показало, что более выгодный путь генерации энергии рухнул.

В опытах на мышах было показано, что штамм *P. aeruginosa*, у которого отсутствовал регулятор множественного фактора вирулентности (MvfR) – фактор транскрипции, необходимый для экспрессии ферментов, синтезирующих 2-АА, не вызывал падения уровня АТФ.

Поскольку бактерии *Pseudomonas* становятся все более устойчивыми к антибиотикам, исследователям необходимо разрабатывать различные типы терапевтических средств для их лечения. Микробиологи предположили, что 2-АА может служить новой мишенью для лекарств – препараты, блокирующие эффекты 2-АА, могут дать макрофагам импульс.

Помимо блокирования 2-АА для борьбы с бактериями, исследователи теоретически могли бы использовать его для предотвращения аутоиммунных заболеваний. При некоторых расстройствах, таких как ревматоидный артрит и волчанка, повышенная активность макрофагов усиливает воспаление. 2-АА – это молекула, которая по своей природе является противовоспалительной, и она может иметь потенциал в качестве иммунодепрессанта.



Pseudomonas Bacteria Escape Immunity by Disrupting Energy Production in Macrophages.
The Scientist Magazine® [Электронный ресурс].

URL: <https://www.the-scientist.com/pseudomonas-bacteria-escape-immunity-by-disrupting-energy-production-in-macrophages-72350> (дата обращения: 08.10.2024).

Филогеномный анализ штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации

Д.А.Ковалев, Н.А.Шапаков, С.В.Писаренко, О.В.Бобрышева, Д.Г.Пономаренко, А.А.Хачатурова, А.Н.Куличенко

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Цель работы – исследование филогенетического положения штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации, в структуре глобальной популяции вида.

Материалы и методы. Выполнено wgSNP-типирование 297 штаммов *B. abortus* основных генетических линий бруцелл из разных регионов мира, включая 68 штаммов, выделенных в Российской Федерации. Секвенирование ДНК проводили на платформе Ion GeneStudio S5 Plus (Life Technologies, США) при использовании набора для быстрой подготовки библиотек ДНК Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США), по протоколу Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Revision D.0).

Результаты. На основе данных полногеномного секвенирования определено, что штаммы *B. abortus*, выделенные на территории Российской Федерации, принадлежат к двум генетическим линиям глобальной популяции вида: С, широко распространенной в странах Европы и Восточной Азии (субгенотипы С1, С2 и С4), и D, к которой относятся большинство известных вакцинных штаммов *B. abortus* (субгенотип D4). В работе описаны наборы специфичных для каждого субгенотипа *B. abortus* SNP, которые могут служить основой для совершенствования методов внутривидовой дифференциации штаммов.

Ключевые слова: *Brucella abortus*, полногеномное секвенирование, wgSNP-типирование, филогения

Для цитирования: Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Филогеномный анализ штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации. Бактериология. 2024; 9(4): 107–114. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-107-114

Phylogenomic analysis of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation

D.A.Kovalev, N.A.Shapakov, S.V.Pisarenko, O.V.Bobrysheva, D.G.Ponomarenko, A.A.Khachaturova, A.N.Kulichenko

Stavropol Scientific Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol, Russian Federation

Objective. Is to study the phylogenetic position of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation in the structure of the global population of the species.

Materials and methods. wgSNP typing of 297 *B. abortus* strains of the main brucella genetic lines from different regions of the world, including 68 strains isolated in the Russian Federation, was performed. DNA sequencing was performed on the “Ion GeneStudio S5 Plus” platform (Life Technologies, USA) using the “Ion Plus Fragment Library Kit for rapid preparation of DNA libraries” (Life Technologies, USA), using the “Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef” protocol (Revision D.0).

Results. Based on genome-wide sequencing data, it was determined that *B. abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation belong to two genetic lines of the global population of the species: C, widespread in Europe and East Asia (subgenotypes C1, C2 and C4), and D, which includes most of the known vaccine strains of *B. abortus* (subgenotype D4). The work describes sets of SNPs specific for each subgenotype of *B. abortus*, which can serve as the basis for improving methods for intraspecific strain differentiation.

Key words: *Brucella abortus*, genome-wide sequencing, wgSNP typing, phylogeny

For citation: Kovalev D.A., Shapakov N.A., Pisarenko S.V., Bobrysheva O.V., Ponomarenko D.G., Khachaturova A.A., Kulichenko A.N. Phylogenomic analysis of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation. Bacteriology. 2024; 9(4): 107–114. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-107-114

Для корреспонденции:

Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставропольский край, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

The article was received 12.01.2024, accepted for publication 25.12.2024

For correspondence:

Dmitry A. Kovalev, PhD in Chemical Sciences, head of Laboratory of Biochemistry, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation

The article was received 22.03.2024, accepted for publication 25.12.2024

В мире ежегодно регистрируется >500 тыс. случаев впервые выявленной бруцеллезной инфекции среди людей. До 70–80% заболеваемости бруцеллезом приходится на долю регионов развитого скотоводства Ближнего Востока, Средиземноморья, Африки, Юго-Восточной Азии, Южной и Центральной Америки. Особенно напряженная ситуация по бруцеллезу отмечается на территориях Восточного Средиземноморья, Северной Африки, Центральной и Восточной Азии [1, 2].

Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в России на протяжении последних лет не имеет стойкой тенденции к улучшению. В последние два года отмечается увеличение среднегодового количества случаев бруцеллеза до 450–600. На долю Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов приходится >90% всей заболеваемости людей бруцеллезом в стране [3].

К наиболее значимым в эпидемиологическом отношении видам возбудителей бруцеллеза относится *Brucella abortus*, представители которого способны вызывать болезнь у различных млекопитающих, главным образом крупного рогатого скота (*Bos taurus*), яков (*Bos grunniens*), гайалов (*Bos frontalis*), бизонов (*Bison* spp.), водяных буйволов (*Bubalus bubalis*), африканских буйволов (*Syncerus caffer*), лосей (*Cervus canadensis*) и верблюдов (*Camelus*), с единичными случаями у лошадей (*Equus*). При этом бруцеллы не обладают строгой специфичностью к основному хозяину и способны поражать эволюционно далеко стоящие виды животных. Как правило, инфекция передается человеку при прямом или косвенном контакте с больными бруцеллезом животными, употреблении в пищу сырых молочных и мясных продуктов, контаминированных бруцеллами [4].

С целью исследования структуры популяции, филогенетических отношений штаммов, выявления источника и путей распространения инфекции широко используются методы мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и мультилокусного анализа числа переменных tandemных повторов (MLVA) [5–9].

В 2016 г. на основе данных MLST A.M.Whatmore et al. предложили классификацию *B. abortus*, согласно которой представители вида подразделяются на 4 основные клады, соответствующие генетическим линиям А, В, С1 и С2 [10]. Штаммы *B. abortus*, выделенные в Кении и Мозамбике в 1963 и 1988 гг., были отнесены к генетической линии А, в то время как другие африканские штаммы – к линии В. Штаммы из стран Ближнего Востока и Азии формировали широко распространенную в Евразии линию С1. Генетическая линия С2 включала основную часть изолятов из Северной и Южной Америки.

В 2023 г. в ходе масштабного анализа одиночных нуклеотидных полиморфизмов в масштабе полного генома (wgSNP) 1074 штаммов *B. abortus* известная классификация вида была дополнена отдельной мономорфной кладой D, соответствующей описанной ранее генетической линии С2 [11].

Метод MLVA менее эффективен для изучения эволюционных отношений и точного определения происхождения изолятов, поскольку соответствующие локусы характеризуются относительно высокой частотой мутаций и проявления гомоплазии [12]. Тем не менее глобальный анализ структуры популяции *B. abortus*, основанный на MLVA, в целом подтверж-

дает выводы, сделанные ранее A.M.Whatmore с использованием MLST [13].

В настоящей работе в качестве инструмента филогенетической реконструкции был выбран метод wgSNP, который является одним из самых эффективных и точных среди современных инструментов исследования эволюционной истории и разнообразия патогенов [11].

Ранее с помощью wgSNP-типирования нами было установлено, что штаммы *B. abortus*, циркулирующие на территории России, относятся к широко распространенной в Евразии линии С1 и имеют общее происхождение от предка из Центральной Азии [14]. Единичные штаммы из регионов Сибири принадлежат к подгенотипам С1а и С1b. Представители подгенотипа С1d – преимущественно штаммы, выделенные на Северном Кавказе и в европейской части страны. Однако накопление новых данных о структуре глобальной популяции возбудителя бруцеллеза и модернизация номенклатуры основных генетических линий вида обуславливают необходимость уточнения филогенетического положения штаммов *B. abortus*, выделенных на территории Российской Федерации.

Целью данной работы было исследование филогенетического положения штаммов *B. abortus*, выделенных на территории Российской Федерации, в структуре глобальной популяции вида.

Материалы и методы

В работе использовали 68 штаммов *B. abortus* из коллекции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (дополнительный файл).

Исследуемые штаммы можно условно разделить по месту выделения на три группы. Первая группа включает 56 штаммов, выделенных на Кавказе и Закавказье в период с 1959 по 2021 г.: Ставропольский край (41 штамм), Карачаево-Черкесская республика (8), Республика Чечня (2), Республика Калмыкия (2), Азербайджанская Республика (2) и Республика Северная Осетия и Алания (1). Все штаммы этой группы выделены от животных, за исключением двух (С-484 и С-653), изолированных от больных людей.

Вторая группа – 4 штамма из Центральной России, выделенные в период с 2017 по 2018 г.: Липецкая область (3) и Самарская область (1). Объектами выделения являлись крупный рогатый скот и молоко коровы.

Третья группа из 9 изолятов относится к территории Сибирского и Дальневосточного федеральных округов, период выделения штаммов – 1945–1985 гг.: Иркутская область (5), Новосибирская область (1), Республика Тыва (1), Республика Бурятия (1) и Хабаровский край (1).

Все исследуемые штаммы *B. abortus* были охарактеризованы в соответствии с традиционной схемой фенотипирования [15]. Культуры имели типичные тинкториальные, морфологические и культуральные свойства. Штаммы принадлежат к семейству *Brucellaceae*, роду *Brucella*, виду *B. abortus*. Определение видовой принадлежности и биовара бруцелл проводили с использованием традиционной схемы: изучение роста штаммов в атмосфере с избыточным содержанием углекислоты и на средах, содержащих фуксин и тионин, оценка способности образования сероводорода и дезамино-

вой активности, агглютинабельности моноспецифическими (A-, M-, R-) сыворотками, чувствительности к бруцеллезным бактериофагам Tb, Wb, Fi, Bk2.

В анализируемой выборке были выявлены представители первого (26 штаммов – 38,2%), третьего (32 штамма – 47,1%), пятого (1 штамм – 1,5%) и шестого (1 штамм – 1,5%) биоваров. У 8 штаммов с использованием классической схемы дифференциации [16] достоверно определить биовар не удалось.

Бактерии культивировали на среде Альбими в течение 48 ч при температуре 37°C, согласно МУК 3.1.7.3402-16 [16]. Обеззараживание проводили в соответствии с СанПиН 3.3686-21 [17] и МУ 1.3.2569-09 [18].

Геномную ДНК выделяли из 0,5 мл обеззараженной микробной взвеси с использованием набора PureLink Genomic DNA Kits (Life Technologies, США).

Контроль качества образцов геномной ДНК осуществляли методами спектрофотометрии, флуориметрии и электрофореза в агарозном геле. Оценку чистоты образцов проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, США), оценивая отношения значений OD260/OD280 и OD260/OD230. Для определения концентрации геномной ДНК использовали флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и набор реагентов Qubit dsDNA HS. Оценку длины фрагментов геномной ДНК проводили путем электрофореза 5 мкл образца в 1%-м агарозном геле. Образец геномной ДНК считали пригодным для дальнейшей работы при значениях OD260/OD280 1,8-2,0; OD260/OD230 >2,0; концентрации >10 нг/мкл и длине фрагментов ДНК >3000 п.н. Подготовленные образцы ДНК хранили при -20°C до дальнейшего использования.

Подготовку ДНК библиотек коротких фрагментов проводили по протоколу IonXpress™ Plusg DNA Fragment Library Preparation (Revision K.0) с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit. Секвенирование библиотек осуществляли на секвенаторе Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Revision D.0).

Оценку качества полученных прочтений проводили с помощью программы FastQC версии 0.11.3 [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/]. В программе Trimmomatic версии 0.33 удаляли прочтения со средним значением качества Q < 20, а также длиной <50 нуклеотидов. Сборку геномных последовательностей выполняли с использованием программного обеспечения GS DeNovo Assembler из программного пакета Newbler (V 3.0). Оценку качества сборки геномов проводили с помощью программы Quast 5.0 [https://github.com/ablab/quast/releases]. В качестве референсной была выбрана геномная последовательность штамма *B. abortus* 2308 (GenBank: GCA_000054005). Полученные геномные последовательности аннотировали в программе PROKKA [https://github.com/tseemann/prokka].

Для последующей филогенетической реконструкции из международной базы данных GenBank были получены все доступные на момент исследования геномные последовательности штаммов *B. abortus*.

Подтверждение видовой принадлежности исследуемых штаммов бруцелл осуществляли на основе виртуальной полимеразной цепной реакции (*in silico* ПЦР) по протоколу

Bruce-Ladder [19] с каждой геномной последовательностью. В результате для последующего анализа из представленных в GenBank данных были отобраны 229 геномных последовательностей.

Множественное выравнивание геномных последовательностей проводили в Parsnp из программного пакета Harvest Suite (параметры -c -e -u -C 1000) [https://harvest.readthedocs.io/en/latest/content/parsnp.html]. Обнаруженные SNP были извлечены в файл VCF с помощью Harvest Tools (версия 1.0). Для улучшения общего качества данных были удалены позиции SNP с расстоянием <10 п.н., а также позиции, несущие неопределенный нуклеотид («N»). Отредактированный файл использовался для компиляции файла FASTA. Визуализацию филогенетического дерева проводили в программе Interactive Tree Of Life (iTOL) v5 [20].

Результаты исследования и их обсуждение

Геномные последовательности 68 штаммов *B. abortus*, выделенных на территории России с 1945 по 2021 г., были определены методом высокопроизводительного секвенирования с использованием платформы Ion GeneStudio S5 Plus. Данные секвенирования каждого штамма были собраны *de novo* в незавершенные геномные проекты.

Среднее количество прочтений составило 1 647 371 на геном (от 1 267 889 до 2 945 072), что обеспечило среднее покрытие генома в 105,9 раза (от 101 до 205). Геномные сборки включали от 2 до 126 контигов, покрывающих от 98,5 до 99,9% последовательности референсного генома (*B. abortus* 2308), N50 выборки – 301 690. Средний размер генома насчитывал 3 251 923 ± 18 000 п.н. Содержание GC варьировало в пределах 56,91–57,30% (среднее значение GC – 57,22%).

В исследуемых геномах методами биоинформационного анализа было обнаружено от 2689 до 3355 кодирующих участков ДНК.

Множественное сопоставление секвенированных геномных последовательностей и 229 геномов из международной базы данных GenBank с референсным образцом позволило выявить 13 872 SNP. Указанный набор SNP был использован для филогенетической реконструкции с использованием метода максимального правдоподобия.

Топология филогенетического дерева, построенного на основе wgSNP-анализа, согласуется с результатами предыдущих исследований [10, 11]. В структуре дерева выделены 4 основные генетические линии (генотипа), обозначенные согласно предложенной в 2023 г. классификации: A, B, C и D (рис. 1).

В ходе изучения корового генома определено 2604 SNP, специфичных для каждого из основных генотипов и подгенотипов *B. abortus*. Из них 1777 расположены на первой хромосоме, 827 – на второй (таблица). Процентное соотношение специфичных SNP в кодирующих и некодирующих областях генома составило 89,35 и 10,65% соответственно.

Анализ филогенетического дерева позволил определить, что штаммы, выделенные на территории Российской Федерации, принадлежат к трем субгенотипам генетической линии C (C1, C2 и C4), а также к одному из субгенотипов линии D (D4).

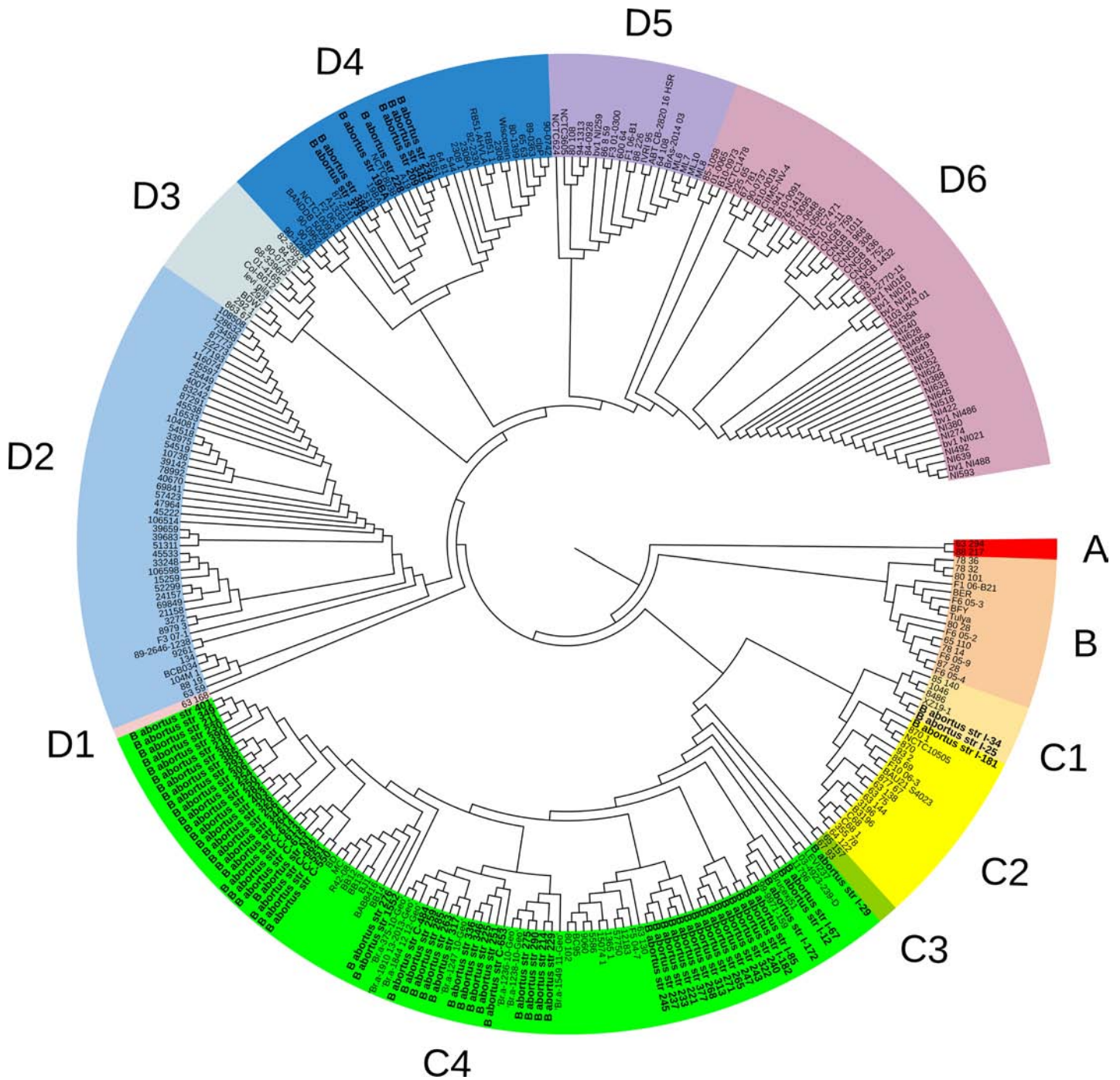


Рис. 1. Филогенетическое дерево на основе данных wgSNP штаммов *Brucella abortus* (полужирным шрифтом выделены штаммы, выделенные на территории Российской Федерации).

Fig. 1. Phylogenetic tree based on wgSNP data of *Brucella abortus* strains (the strains isolated on the territory of the Russian Federation are highlighted in bold).

По результатам исследования генотип С включает четыре субгенотипа, обозначенных как С1-С4. Нами обнаружено 103 SNP, специфичных для генетической линии С.

Субгенотип С1 включает штаммы, выделенные в России (I-25, Иркутск, 1958 и I-34, Хабаровск, 1958), Греции и Италии (107 специфичных SNP). Одной из возможных причин выделения штаммов субгенотипа С1, распространённого главным образом в странах Европы, на территории Сибири во второй половине XX века могла быть послевоенная практика вынужденного переселения жителей сельской местности вместе с домашним скотом, в т.ч. в Красноярский

край, Кемеровскую и Иркутскую области из Прибалтики, Западной Украины, а также с Кавказа.

К субгенотипу С2 отнесены штаммы, выделенные в странах Азии: Боливии, Индии, Бангладеш и Таиланде. Кроме того, субгенотип включает штаммы из Германии, Франции и Великобритании, а также 1 штамм из России (И-181, Новосибирск, 1982). Представители субгенотипа С2 отличаются от других изученных штаммов выборки набором из 97 SNP. Регистрация единственного штамма субгенотипа С2 в Сибири может быть ассоциирована с завозным случаем бруцеллеза. Однако для подтверждения наличия или отсут-

путем «замещения» циркуляции полевого патогенного штамма на аттенуированный. Учитывая, что к генетической линии D относятся вакцинные штаммы *B. abortus* и их производные, можно предположить связь появления изученных штаммов субгенотипа D4 с применением экспериментальных живых вакцинных препаратов против бруцеллеза и активным внедрением *B. abortus* 19 на территориях Советского Союза, неблагополучных по бруцеллезу. Также нельзя исключать завоз в СССР с импортируемым из-за рубежа скотом полевых штаммов *B. abortus*, имеющих общее филогенетическое происхождение со штаммами бруцелл, которые использовались в первой половине и середине XX века в качестве производных для разработки кандидатных препаратов живых противобруцеллезных вакцин (*B. abortus* 68, 519, 70, 150 и др.).

В работе описаны наборы специфичных для каждого субгенотипа *B. abortus* SNP, которые могут служить основой для совершенствования методов внутривидовой дифференциации штаммов.

Эффективность применения оптимизированного алгоритма wgSNP-типирования неоднократно подтверждалась в ходе эпидемиологических расследований вспышек бруцеллеза в 2021–2023 гг. в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза.

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 Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Hayoun MA, Muco E, Shorman M. Brucellosis. 2023 Apr 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. PMID: 28722861
- Moriyón I, Blasco JM, Letesson JJ, De Massis F, Moreno E. Brucellosis and One Health: Inherited and Future Challenges. *Microorganisms*. 2023 Aug 11;11(8):2070. DOI: 10.3390/microorganisms11082070
- Пономаренко ДГ, Хачатуров АА, Ковалёв ДА, Скударева ОН, Лукашевич ДЕ, Жаринова ИВ, и др. Анализ заболеваемости бруцеллезом и молекулярно-генетическая характеристика популяции бруцелл на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(2):61-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-61-74
- Brucellosis in humans and animals. Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health. Principal author: M.J. Corbel. WHO/CDS/EPR/2006.7. ISBN 92 4 154713 8
- Kumari G, Doimari S, Suman Kumar M, Singh M, Singh DK. MLVA typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* isolates of animal and human origin from India. *Anim Biotechnol*. 2023 Apr;34(2):375-383. DOI: 10.1080/10495398.2021.1971685
- Анисимова ЕА, Миргазов ДА, Додонова ЕА, Елизарова ИА, Панкова ЕВ, Осянин КА. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;4:42-49. DOI:10.21055/0370-1069-2023-4-42-49
- Liu G, Ma X, Zhang R, Lü J, Zhou P, Liu B, et al. Epidemiological changes and molecular characteristics of *Brucella* strains in Ningxia, China. *Front Microbiol*. 2024 Jan 19;15:1320845. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1320845
- Özmen M, Özgen EK, Sayı O, Karadeniz Pütür E, Okumuş B, İba Yılmaz S, et al. Genotyping of *Brucella* isolates from animals and humans by Multiple-Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2023 May;96:101981. DOI: 10.1016/j.cimid.2023.101981
- Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, et al. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. *J Microbiol Methods*. 2023 Aug;211:106772. DOI: 10.1016/j.mimet.2023.106772
- Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. *Front Microbiol*. 2016 Dec 21;7:2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049
- Janke NR, Williamson CHD, Drees KP, Suárez-Esquivel M, Allen AR, Ladner JT, et al. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front Microbiol*. 2023 Nov 29;14:1287046. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1287046
- Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
- Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006. *Front Microbiol* 2018.
- Kovalev DA, Ponomarenko DG, Pisarenko SV, Shapakov NA, Khachaturova AA, Serdyuk NS, et al. Phylogeny of *Brucella abortus* strains isolated in the Russian Federation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2021; 14(7):323-329. DOI: 10.4103/1995-7645.320523
- Таран ИФ, Лямкин ГИ. Бруцеллез: (Микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика). Ставрополь, 1996.
- Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза. Методические указания. МУК 3.1.7.3402-16 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 10 ноября 2016 г.).
- Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28 ноября 2013 г.).
- Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания. МУ 1.3.2569-09 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22 декабря 2009 г.).
- Идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов. Методические рекомендации. МР 4.2.0288-22 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 мая 2022 г.).
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W293-W296. DOI: 10.1093/nar/gkab301
- Здродовский ПФ. Бруцеллез. Изд-во Академии медицинских наук СССР. М., 1948.
- Кулаков ЮК. Молекулярные аспекты персистенции бруцелл. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016;34(1):3-8. DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-1-3-8
- Prasolova O, Krylova E, Bogomazova A, Soltynskaya I, Sklyarov O, Gordeeva V, et al. Russian collection of *Brucella abortus* vaccine strains: annotation, implementation and genomic analysis. *Front Vet Sci*. 2023 Jun 21;10:1154520. DOI: 10.3389/fvets.2023.1154520

24. Куринский МС, Ахматов БП, Дудин СЯ, Всяких АС. Импортный скот в СССР: разведение и использование. М.: Изд-во Колос, 1976.

References

- Hayoun MA, Muco E, Shorman M. Brucellosis. 2023 Apr 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. PMID: 28722861
- Moriyón I, Blasco JM, Letesson JJ, De Massis F, Moreno E. Brucellosis and One Health: Inherited and Future Challenges. *Microorganisms*. 2023 Aug 11;11(8):2070. DOI: 10.3390/microorganisms11082070
- Ponomarenko DG, Khachaturova AA, Kovalev DA, Skudareva ON, Lukashevich DE, Zharinova IV, et al. Analysis of Brucellosis Incidence and Molecular-Genetic Characteristics of *Brucella* Population in the Territory of the Russian Federation. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(2):61-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-61-74 (In Russian).
- Brucellosis in humans and animals. Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health. Principal author: M.J. Corbel. WHO/CDS/EPR/2006.7. ISBN 92 4 154713 8.
- Kumari G, Doimari S, Suman Kumar M, Singh M, Singh DK. MLVA typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* isolates of animal and human origin from India. *Anim Biotechnol*. 2023 Apr;34(2):375-383. DOI: 10.1080/10495398.2021.1971685
- Anisimova EA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Pankova EV, Osyanin KA. Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;4:42-49. DOI:10.21055/0370-1069-2023-4-42-49 (In Russian).
- Liu G, Ma X, Zhang R, Lü J, Zhou P, Liu B, et al. Epidemiological changes and molecular characteristics of *Brucella* strains in Ningxia, China. *Front Microbiol*. 2024 Jan 19;15:1320845. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1320845
- Özmen M, Özgen EK, Sayı O, Karadeniz Pütür E, Okumuş B, İba Yılmaz S, et al. Genotyping of *Brucella* isolates from animals and humans by Multiple-Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2023 May;96:101981. DOI: 10.1016/j.cimid.2023.101981
- Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, et al. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. *J Microbiol Methods*. 2023 Aug;211:106772. DOI: 10.1016/j.mimet.2023.106772
- Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. *Front Microbiol*. 2016 Dec 21;7:2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049
- Janke NR, Williamson CHD, Drees KP, Suárez-Esquivel M, Allen AR, Ladner JT, et al. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front Microbiol*. 2023 Nov 29;14:1287046. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1287046
- Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
- Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006. *Front Microbiol* 2018.
- Kovalev DA, Ponomarenko DG, Pisarenko SV, Shapakov NA, Khachaturova AA, Serdyuk NS, et al. Phylogeny of *Brucella abortus* strains isolated in the Russian Federation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2021;14(7):323-329. DOI: 10.4103/1995-7645.320523
- Taran IF, Lyamkin GI. Brucellyoz: (Mikrobiologiya, immunologiya, epidemiologiya, profilaktika). Stavropol', 1996. (In Russian).
- Epidemiologicheskij nadzor i laboratornaya diagnostika brucelleza. Metodicheskie ukazaniya. MUK 3.1.7.3402-16 (Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 10 november 2016). (In Russian).
- Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infekcionnyh boleznej. SanPiN 3.3686-21 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 28 november 2013). (In Russian).
- Organizaciya raboty laboratorij, ispol'zuyushchih metody amplifikacii nukleinovyh kislot pri rabote s materialom, soderzhashchim mikroorganizmy I-IV grupp patogennosti. Metodicheskie ukazaniya. MU 1.3.2569-09 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 22 december 2009). (In Russian).
- Identifikaciya i tipirovaniye shtammov brucell s ispol'zovaniem molekulyarno-biologicheskikh metodov. Metodicheskie rekomendacii. MR 4.2.0288-22 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 30 may 2022). (In Russian).
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W293-W296. DOI: 10.1093/nar/gkab301
- Zdrodovskij PF. Brucellez. Izd-vo Akademii medicinskih nauk SSSR. M., 1948. (In Russian).
- Kulakov YuK. Molecular Aspects of *Brucella* Persistence. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya)*. 2016;34(1):3-8. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-3-8 (In Russian).
- Prasolova O, Krylova E, Bogomazova A, Soltynskaya I, Sklyarov O, Gordeeva V, et al. Russian collection of *Brucella abortus* vaccine strains: annotation, implementation and genomic analysis. *Front Vet Sci*. 2023 Jun 21;10:1154520. DOI: 10.3389/fvets.2023.1154520
- Kurinsky MS, Akhmatov BP, Dudin SYa, Vsyakikh AS. Importnyi skot v SSSR: razvedenie i ispol'zovanie. M.: Publ. Kolos, 1976. (In Russian).

Информация об авторах:

Шапаков Николай Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории биохимии, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Писаренко Сергей Владимирович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Бобрышева Ольга Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Пономаренко Дмитрий Григорьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией бруцеллеза, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Хачатурова Анна Андреевна, аспирант, биолог лаборатории бруцеллеза, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about authors:

Nikolay A. Shapakov, Junior Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Sergey V. Pisarenko, PhD in Chemical Sciences, Leading Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Olga V. Bobrysheva, Junior Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Dmitry G. Ponomarenko, PhD in Biological Sciences, head of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Anna A. Khachaturova, graduate student, biologist of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Alexandr N. Kulichenko, MD, PhD, DSc, professor, academic RAS, director, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Антагонистическая активность бактерий рода *Lactobacillus* в отношении ESKAPE-патогенов

Д.А.Чистякова, А.А.Шафикова, М.В.Спивак, И.А.Лягина, А.Р.Мелкумян, Б.А.Нанаева,
А.В.Варданян, С.И.Ачкасов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава
России, Москва, Российская Федерация

Цель исследования. Изучение антагонистического действия лактобацилл в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы. Для эксперимента были созданы 2 группы микроорганизмов: «хищники» и «жертвы». К «хищникам» были отнесены 19 штаммов лактобацилл. В группу «жертв» были отобраны 6 различных видов микроорганизмов из группы ESKAPE-патогенов, обладающих антибиотикорезистентностью. Для поиска штаммов лактобацилл, синтезирующих бактериоцины, применяли метод двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы.

Результаты. Оценка антагонистического действия бактериоцина изученных лактобацилл проводилась по отношению к 10 штаммам – представителям каждого вида микроорганизмов с выявленной полирезистентностью к антибактериальным препаратам. По данным анализа получено, что бактериоцины определенных штаммов лактобацилл проявили подавляющее действие в больших разведениях.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антагонистическое действие лактобацилл в отношении полирезистентных микроорганизмов заключается в продуцировании ими бактериоцинов, обладающих узконаправленной или широкой активностью в отношении антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

Ключевые слова: бактериоцины, лактобациллы, аутопробиотики, антибиотикорезистентность, антагонистическая активность

Для цитирования: Чистякова Д.А., Шафикова А.А., Спивак М.В., Лягина И.А., Мелкумян А.Р., Нанаева Б.А., Варданян А.В., Ачкасов С.И. Антагонистическая активность бактерий рода *Lactobacillus* в отношении ESKAPE-патогенов. Бактериология. 2024; 9(4): 115–119. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-115-119

Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria against ESKAPE pathogens

D.A.Chistyakova, A.A.Shafikova, M.V.Spivak, I.A.Lyagina, A.R.Melkumyan, B.A.Nanaeva,
A.V.Vardanyan, S.I.Achkasov

Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology, Moscow, Russian Federation

Objective. To study the antagonistic action of lactobacilli strains against antibiotic-resistant strains of microorganisms.

Materials and methods. For the experiment, 2 groups of microorganisms were created: “predators” and “victims”. 19 strains of lactobacilli were classified as “predators”. 6 different types of microorganisms from the ESKAPE group – pathogens with antibiotic resistance – were selected for the “victim” group. For searching lactobacilli strains that synthesize bacteriocins, we used a two-stage cultivation method of the microorganism-antagonist and the test culture under the conditions of a combined system.

Results. The antagonistic effect of the bacteriocin of the studied lactobacilli was assessed for 10 strains, representatives of each type of microorganism with revealed multiresistance to antibacterial drugs. According to the analysis, it was found that bacteriocins of certain strains of lactobacilli showed an inhibitory effect in high dilutions.

Conclusion: the results obtained indicate that the antagonistic effect of lactobacilli against multidrug-resistant microorganisms consists in their production of bacteriocins with narrowly targeted or broad activity against antibiotic-resistant strains of bacteria.

Key words: bacteriocins, lactobacilli, autoprobiotics, antibiotic resistance, antagonistic activity

For citation: Chistyakova D.A., Shafikova A.A., Spivak M.V., Lyagina I.A., Melkumyan A.R., Nanaeva B.A., Vardanyan A.V., Achkasov S.I. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria against ESKAPE pathogens. Bacteriology. 2024; 9(4): 115–119. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-115-119

Для корреспонденции:

Чистякова Дарья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Адрес: 123423, Москва, ул. Салаям Адила, 2

Статья поступила 27.04.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Daria A. Chistyakova, Junior Research assistant of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Address: 2 Salam Adil str., Moscow, 123423, Russian Federation

The article was received 27.04.2024, accepted for publication 25.12.2024

Распространение резистентных к антибактериальным препаратам штаммов микроорганизмов и их неуклонный рост во всем мире снижает эффективность лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями. Поэтому чрезвычайно актуальны исследования, направленные на поиск новых альтернативных методов лечения. Лактобациллы являются одним из микроорганизмов, которые, обладая способностью к синтезу новых антибактериальных веществ класса бактериоцинов, оказывают выраженное антагонистическое воздействие как на грамположительные, так и на грамотрицательные патогенные бактерии [1].

Бактериоцины представляют собой вещества белковой природы, содержащие в своей структуре полипептиды, белки, полисахариды, обладающие активностью в отношении одного или нескольких штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [2].

В последние годы был опубликован ряд исследований, показывающих, что бактериоцины могут использоваться в качестве альтернативы антибактериальным препаратам для профилактики и/или лечения бактериальных инфекций [3, 4]. В доступных источниках не были обнаружены данные о развитии резистентности микроорганизмов к бактериоцинам благодаря наличию быстрого механизма порообразования, подверженности разложению протеолитическими ферментами и короткому биологическому периоду полувыведения из организма человека [5].

В последние годы ряд исследований показали, что бактериоцины лактобацилл влияют на микробный спектр желудочно-кишечного тракта, устраняя патогены, а также защищая кишечник от возможной бактериальной колонизации. Бактериоцины лактобацилл способны ингибировать такие патогенные микроорганизмы, как *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* [6, 7]. Было показано, что некоторые бактериоцины очень эффективны при лечении инфекций, вызванных штаммами с лекарственной устойчивостью [8]. Учитывая масштаб распространения резистентных штаммов и снижение эффективности существующих схем антибиотикотерапии в клинической практике, бактериоцины, полученные из лактобацилл, можно рассматривать как альтернативный и достаточно перспективный путь в лечении кишечных инфекций [9, 10].

Цель исследования: изучение антагонистического действия лактобацилл в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, находящиеся в коллекции референс-центра Минздрава России, созданного на базе ФГБУ НМИЦ колопроктологии им. А.Н.Рыжих. Для эксперимента были созданы 2 группы микроорганизмов: «хищники» и «жертвы». К «хищникам» были отнесены 19 штаммов лактобацилл: *Levilactobacillus brevis* ($n = 4$), *Ligilactobacillus salivarius* ($n = 3$), *Limosilactobacillus fermentum* ($n = 3$), *Lactiplantibacillus pentosus* ($n = 2$), *Lactiplantibacillus plantarum*

($n = 2$), *Lactobacillus johnsonii* ($n = 2$), *Lactobacillus delbrueckii* ($n = 2$), *Lactobacillus gasseri* ($n = 1$).

В группу «жертв» были отобраны ESKAPE-патогены, которые обладают резистентностью к различным группам антибиотиков, что превращает их в настоящий бич стационара: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *S. aureus*.

Представители исследуемых групп («жертвы» – «хищники») хранились в криобанке при температуре -80°C . Восстановление лактобацилл проводили в MRS-бульоне (Condalab, Испания), затем высевали на плотную питательную среду MRS (Condalab, Испания) и термостатировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе, а микроорганизмы из группы «жертв» высевались на плотные селективные питательные среды.

Для поиска штаммов, синтезирующих бактериоцины, применяли метод двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы [11].

Результат оценивали по зонам задержки роста: от 25 до ≥ 40 мм – высокая; 25–15 мм – средняя; 5–15 мм – низкая антагонистическая активность; ≤ 5 мм – антагонизм отсутствует (рис. 1).

Клеточную суспензию лактобацилл («хищников») мутностью 1 McF в количестве 1 мл вносили в 10 мл MRS-бульона и инкубировали 48 ч в CO_2 -инкубаторе. Бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 оборотов 10 мин. Для определения минимальной подавляющей концентрации активного пробиотического вещества лактобацилл использовали супернатант культуральной жидкости методом серийных разведений. Предварительно в каждую лунку добавляли 100 мкл бульона Мюллера–Хинтона (Condalab, Испания), в которые затем вно-

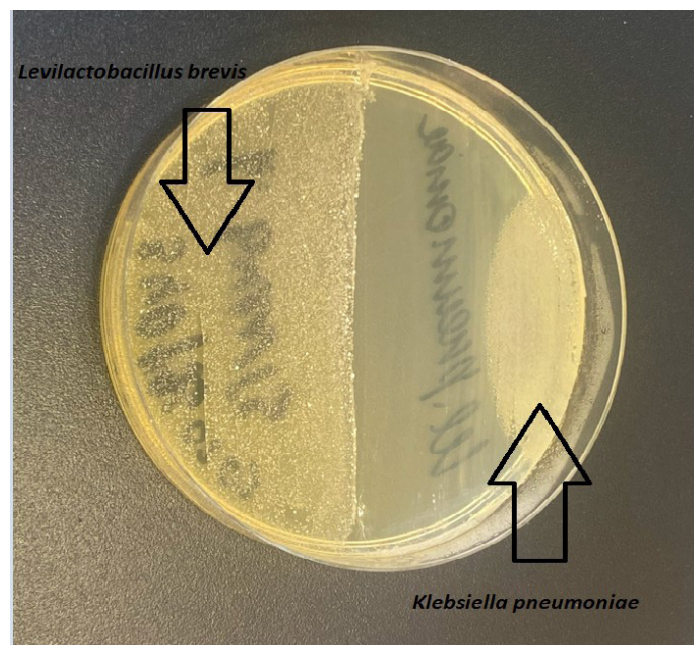


Рис. 1. Комбинированная система культивирования бактерий для полуколичественной оценки антагонистической активности *L. brevis* относительно *K. pneumoniae*.

Fig. 1. A combined bacterial culture system for a semi-quantitative assessment of the antagonistic activity of *L. brevis* relative to *K. pneumoniae*.

Таблица. Антагонистическая активность лактобацилл в отношении микроорганизмов с полирезистентностью
Table. Antagonistic activity of lactobacilli against microorganisms with polyresistance High Medium Low

Штаммы лактобацилл / Lactobacillus strains	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Enterococcus spp.</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low
<i>L. johnsonii</i> 214	+			+						+					+
<i>L. fermentum</i> 353	+			+						+					+
<i>L. brevis</i> 13		+			+					+			+		+
<i>L. delbrueckii</i> CTR101ZT	+				+								+		+
<i>L. johnsonii</i> 8M15Д				+						+					
<i>L. delbrueckii</i> 296c21				+	+										+
<i>L. fermentum</i> 515													+		
<i>L. gasserii</i> 5M140		+			+								+		+
<i>L. brevis</i> 340		+			+								+		+
<i>L. salivarius</i> 75c	+			+				+					+		+
<i>L. brevis</i> 472	+			+				+					+		+
<i>L. pentosus</i> 3022							+			+					+
<i>L. pentosus</i> 222	+			+				+					+		+
<i>L. brevis</i> 224	+			+									+		+
<i>L. plantarum</i> 20A	+			+				+					+		+
<i>L. salivarius</i> 253Z21	+			+				+					+		+
<i>L. fermentum</i> 18A	+			+				+					+		+
<i>L. plantarum</i> 19A	+			+				+					+		+
<i>L. salivarius</i> 24c_23	+			+				+					+		+

силы по 100 мкл суспензии мутностью 0,5 McF микроорганизмов («жертвы») и далее добавляли по 100 мкл соответствующих разведений супернатанта. Планшеты инкубировали в термостате в течении 24–48 ч при температуре 37°C. Результат оценивали визуально. Из лунок, в которых отсутствовал рост микроорганизмов, проводили высев на питательные среды.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам определения антагонистической активности методом двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы лактобациллы ранжировались в зависимости от степени их антагонистической активности на высокую, среднюю и низкую (таблица).

Среди 19 исследуемых лактобацилл наибольшую антагонистическую активность проявили 10 штаммов микроорганизмов семейства *Lactobacillaceae* рода *Lactobacillus*: *L. salivarius* 75c, *L. brevis* 472, *L. pentosus* 222, *L. plantarum* 20A, *L. salivarius* 253Z21, *L. fermentum* 18A, *L. plantarum* 19A, *L. salivarius* 24c_23, *L. brevis* 224, *L. fermentum* 353 (рис. 2).

Оценка антагонистического действия бактериоцина изученных лактобацилл проводилась по отношению к 10 представителям каждого вида полирезистентных микроорганизмов. По данным оценки выявлено, что бактериоцины определенных штаммов лактобацилл проявили подавляющее действие в больших разведениях. В частности, при оценке

действия бактериоцина к полирезистентным представителям вида *P. aeruginosa* бактериоцины от *L. salivarius* 75c в 1 случае проявил активность в разведении 1/16, также в 1 случае – в разведении 1/8. Остальные лактобациллы проявили активность в меньших разведениях.

При оценке действия бактериоцина к полирезистентным представителям вида *K. pneumoniae* бактериоцины от

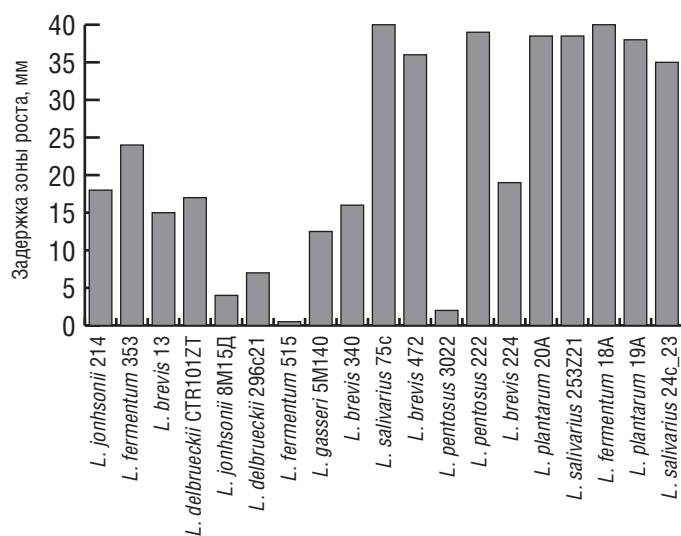


Рис. 2. Активность лактобацилл в отношении микроорганизмов с полирезистентностью.

Fig. 2. Activity of lactobacilli against microorganisms with polyresistance.

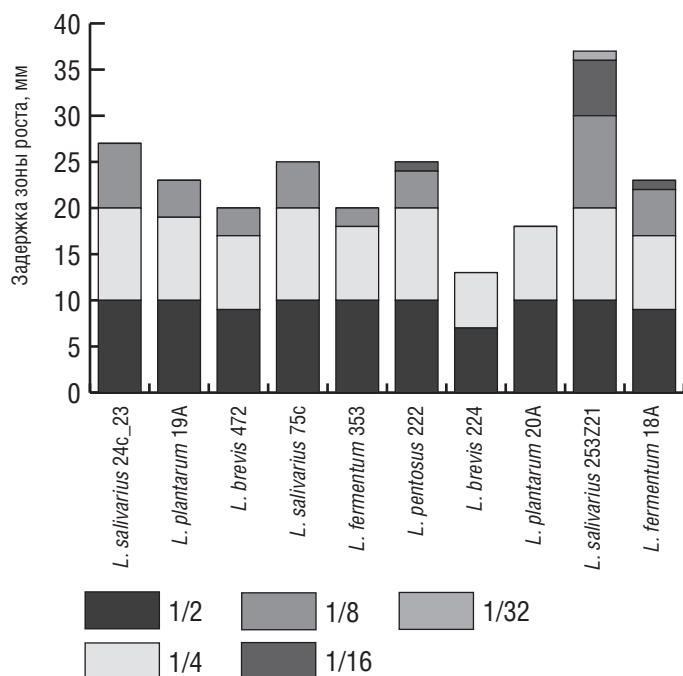


Рис. 3. Случаи подавления роста представителей вида *K. pneumoniae* бактериоцинами (в разведениях) исследуемых лактобацилл.

Fig. 3. Cases of suppression of the growth of representatives of the *K. pneumoniae* species by bacteriocins (in dilutions) of the studied lactobacilli.

L. salivarius 253Z21 в 1 случае проявил активность в разведении 1/32, в 6 случаях – в разведении 1/16. Остальные лактобациллы проявили активность в меньших разведениях (рис. 3).

Антагонистическое действие бактериоцина к полирезистентным представителям вида *E. coli*: бактериоцин от *L. salivarius* 253Z21 в одном случае проявил активность в разведении 1/8.

Однако при исследовании антагонистических свойств бактериоцинов лактобацилл было отмечено отсутствие действия на представителей грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*, *Enterococcus* spp.).

Таким образом, перспективными для дальнейшего изучения антагонистического действия бактериоцинов являются 2 штамма лактобацилл: *L. salivarius* 253Z21 и *L. salivarius* 75c.

Заключение

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что лактобациллы способны продуцировать вещества (бактериоцины), обладающие антагонистическими свойствами в отношении полирезистентных микроорганизмов.

Первый этап исследования позволил выявить 10 штаммов лактобацилл, обладающих высокой антагонистической активностью в отношении полирезистентных грамотрицательных бактерий. При дальнейшем исследовании супернатанта высокоактивных лактобацилл отмечено, что 2 штамма лактобацилл (*L. salivarius* 253Z21 и *L. salivarius* 75c) являются продуцентами бактериоцинов, которые в перспективе могут использоваться в качестве альтернативы антибактериальным препаратам при лечении бактериальных ин-

фекций у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Информация о финансировании

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания №1023022000100-9-1.6.2.

Financial support

The study was conducted as part of the implementation of state assignment No 1023022000100-9-1.6.2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Kohoutova D, Forstlova M, Moravkova P, Cyrany J, Bosak J, Smajs D, et al. Bacteriocin production by mucosal bacteria in current and previous colorectal neoplasia. *BMC Cancer*. 2020 Jan 16;20(1):39. DOI: 10.1186/s12885-020-6512-5
- Anjana, Tiwari SK. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 16;12:851140. DOI: 10.3389/fcimb.2022.851140
- Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, et al. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Lab Anal*. 2022 Jan;36(1):e24093. DOI: 10.1002/jcla.24093
- Fernandes A, Jobby R. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022 Oct;194(10):4377-4399. DOI: 10.1007/s12010-022-03870-3
- Dicks LMT, Dreyer L, Smith C, van Staden AD. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut-Blood Barrier? *Front Microbiol*. 2018 Sep 28;9:2297. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02297
- Liu Z, Xu C, Tian R, Wang W, Ma J, Gu L, et al. Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2021 Jul 15;22(7):533-547. DOI: 10.1631/jzus.B2000602
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. *J Biosci Bioeng*. 2022 Oct;134(4):277-287. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2022.07.007
- Heilbronner S, Krismer B, Brötz-Oesterhelt H, Peschel A. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Nov;19(11):726-739. DOI: 10.1038/s41579-021-00569-w
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Apr;100(7):2939-51. DOI: 10.1007/s00253-016-7343-9
- Garbacz K. Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Semin Cancer Biol*. 2022 Nov;86(Pt 3):356-366. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.12.013
- Сухина МА, Жуховицкий ВГ, Шельгин ЮА. Способ оценки антагонистической активности лактобацилл толстокишечного биотопа пациента относительно разнообразных бактерий двухэтапным культивированием микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы. 2018. / Sukhina MA, Zhukhovitskii VG, Shelygin YuA. Sposob otsenki antagonistscheskoi aktivnosti laktobatsill tolstokishechnogo biotopa patsienta otноситel'no raznootbraynykh bakterii dvukhetapnym kul'tivirovaniem mikroorganizma-antagonista i testiruemoi kul'tury v usloviyakh kombinirovannoi sistemy. 2018. (In Russian).

Информация о соавторах:

Шафикова Анастасия Александровна, врач-бактериолог отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Спивак Михаил Владимирович, младший научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Лягина Ирина Анатольевна, заведующая лабораторией микробиологии-биолог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Мелкумян Алина Рантиковна, кандидат медицинских наук, руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Нанаева Белла Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая гастроэнтерологическим отделением ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Вардanian Армен Восканович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением хирургии воспалительных заболеваний кишечника ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих»

Ачкасов Сергей Иванович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Information about co-authors:

Anastasia A. Shafikova, bacteriologist-doctor of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Mikhail V. Spivak, Junior Research assistant of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Irina A. Lyagina, Head of microbiological Laboratory-biologist, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Alina R. Melkumyan, MD, PhD, Head of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Bella A. Nanaeva, MD, PhD, Head of Gastroenterology Department, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Armen V. Vardanyan, MD, PhD, Head of the IBD surgery department, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Sergey I. Achkasov, corresponding RAS member, MD, PhD, DSc, professor, Director of Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Борьба с туберкулезом

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

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

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

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

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

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

Липополисахариды – антигенная основа для вакцинации против септического и эндотоксического шока

С.В.Коробова¹, О.И.Науменко², Б.И.Алхазова¹, П.А.Стряхнин¹, Е.В.Кожина¹, М.Э.Головина¹, П.Г.Апарин¹

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация;

²Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Сепсис и его осложнение септический шок – одни из ведущих причин смертности в клинической практике. Грамотрицательные бактерии являются основными этиологическими агентами, приводящими к их развитию. Из-за растущей устойчивости бактерий к антибиотикам необходимы новые подходы для профилактики сепсиса. Превентивная вакцинация в группах риска может значительно сократить число случаев его возникновения. Липополисахарид, структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, может послужить хорошей основой для противошоковых вакцин. В данном обзоре описано его строение, механизмы развития как врожденного, так адаптивного иммунного ответа при попадании липополисахарида в организм. Рассмотрены доклинические и клинические исследования кандидатных вакцинных антигенов на основе липополисахарида для профилактики сепсиса и септического шока.

Ключевые слова: липополисахарид, сепсис, эндотоксический шок, эндотоксическая толерантность, врожденный иммунитет, вакцина

Для цитирования: Коробова С.В., Науменко О.И., Алхазова Б.И., Стряхнин П.А., Кожина Е.В., Головина М.Э., Апарин П.Г. Липополисахариды – антигенная основа для вакцинации против септического и эндотоксического шока. Бактериология. 2024; 9(4): 120–129. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-120-129

Lipopolysaccharides are antigenic basis for vaccination against septic and endotoxic shock

S.V.Korobova¹, O.I. Naumenko², B.I.Alkhazova¹, P.A.Stryakhnin¹, E.V.Kozhinova¹, M.E.Golovina¹, P.G.Aparin¹

¹SRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation;

²N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Sepsis and its complication septic shock are among the key causes of mortality in clinical practice. Gram-negative bacteria are the main etiologic agents that induces their development. Due to growing resistance to antibiotics, new approaches are needed to prevent sepsis. Preventive vaccination in risk groups can significantly reduce the number of cases of its occurrence. Lipopolysaccharide, a structural component of the cell wall of gram-negative bacteria, can serve as a good basis for anti-shock vaccines. This review describes its structure, the mechanisms of development of both innate and adaptive immune responses when lipopolysaccharide enters the body. Preclinical and clinical studies of candidate vaccine antigens based on lipopolysaccharide for the prevention of sepsis and septic shock are considered.

Key words: lipopolysaccharide, sepsis, endotoxic shock, endotoxic tolerance, innate immunity, vaccine

For citation: Korobova S.V., Naumenko O.I., B.I.Alkhazova B.I., Stryakhnin P.A., Kozhinova E.V., Golovina M.E., Aparin P.G. Lipopolysaccharides are antigenic basis for vaccination against septic and endotoxic shock. Bacteriology. 2024; 9(4): 120–129. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-120-129

Для корреспонденции:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, отдел иммунной биотехнологии, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2

Статья поступила 30.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Svetlana V. Korobova, PhD in Biological Sciences, laboratory of polysaccharide vaccines, department of immune biotechnology, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Address: 24 b, 2 Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russian Federation

The article was received 30.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

Сепсис остается одной из ведущих причин смертности в клинической практике. Всемирная организация здравоохранения дает следующее определение сепсиса: «Сепсис – это опасное состояние, которое развивается на фоне чрезмерного ответа иммунной системы организма на инфекцию. Ответная реакция организма приводит к повреждению собственных тканей и органов». Септический шок представляет собой разновидность сепсиса, при котором лежащие в основе нарушения кровообращения и клеточного метаболизма являются достаточно глубокими, что существенно увеличивают смертность [1]. Этиологическими агентами, приводящими к развитию сепсиса, являются грамположительные, грамотрицательные бактерии, анаэробные микроорганизмы и грибы, а наиболее частыми местами поражения инфекцией – легкие, брюшная полость и мочевыводящие пути [2].

Грамотрицательные бактерии (семейства *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp.) – распространенная причина развития сепсиса у людей. Особенностью строения этих бактерий является наличие внешней мембраны клетки, основным структурным и антигенным компонентом которой является липополисахарид (ЛПС). ЛПС – сильный иммуностимулятор у млекопитающих, особенно у человека. Даже введение низких доз ЛПС человеку стимулирует развитие иммунного ответа и одновременно симптомы сеп-

тического состояния [3]. Поэтому превентивная вакцинация против грамотрицательной бактериальной инфекции в группах риска может значительно сократить количество случаев развития сепсиса и вызванных им осложнений, в т.ч. эндотоксического шока. Можно выделить следующие целевые группы для вакцин против эндотоксического шока:

- профессии, связанные с высоким риском получения травм;
- пациенты с «протекающим» кишечником (ВИЧ, операция шунтирования, лучевое поражение, химиотерапия);
- пациенты, перенесшие плановую операцию на желудочно-кишечном и генитально-уринальном трактах;
- пациенты, проходящие курс иммуносупрессии (Patients undergoing immunosuppression);
- пациенты с острыми травмами или ожогами; пациенты отделения интенсивной терапии.

Клиническое течение септических состояний, вызванных грамотрицательными бактериями, в ряде случаев может быть существенно отягощено значительной продукцией эндотоксина, эндотоксикозом, что способствует развитию септического шока.

Перспективной стратегией является противошоковая иммунизация различными структурными вариантами молекул ЛПС грамотрицательных бактерий. Данный обзор посвящен профилактике септического и эндотоксического шока.

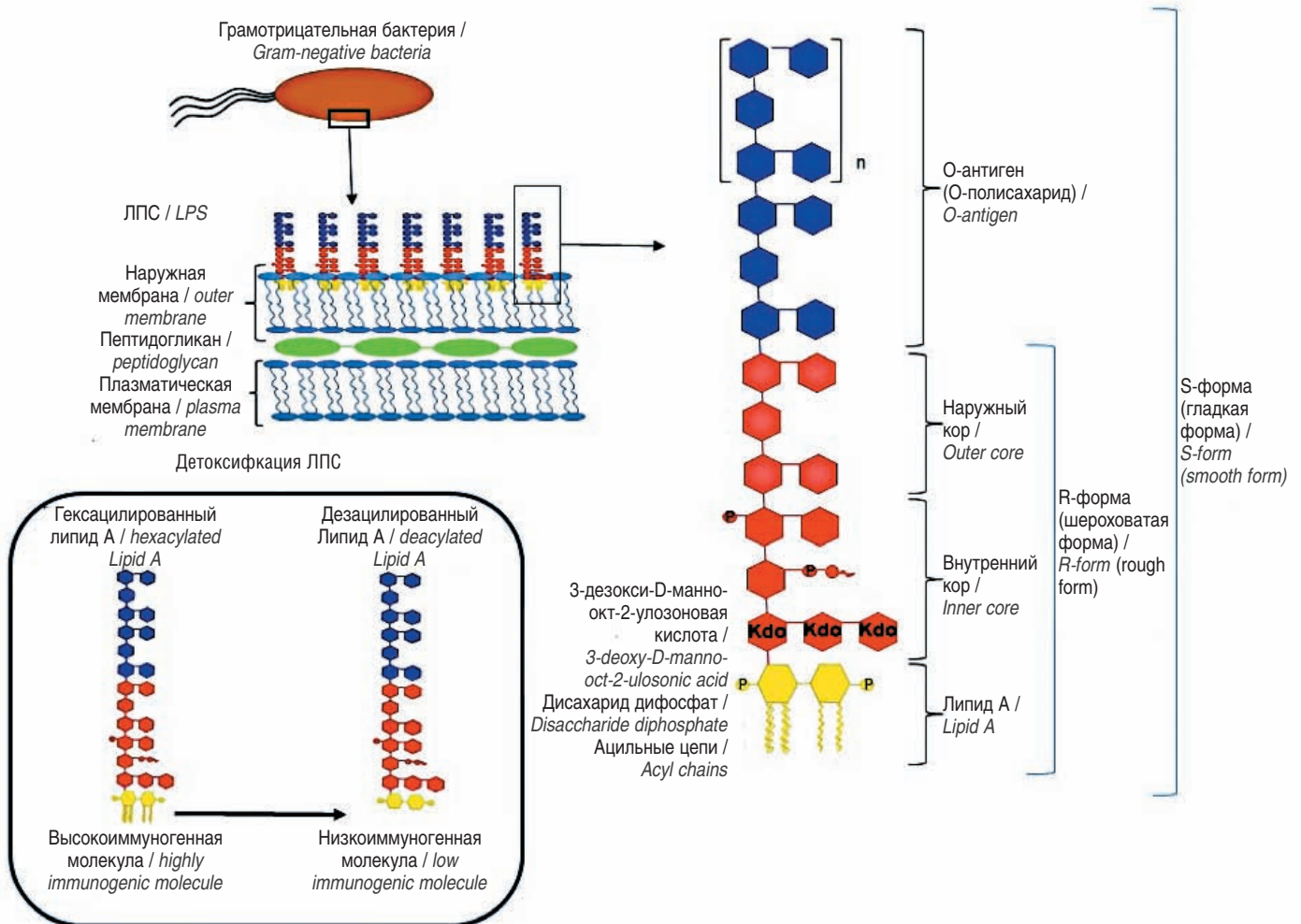


Рис. 1. Строение молекулы ЛПС.
 Fig. 1. LPS molecule structure.

Строение молекулы ЛПС

В 1890 г. Ричардом Пфайфером были введены понятия «эндотоксин» и «экзотоксин». Эндотоксинами он назвал вещества, которые образуются при распаде бактериальной клетки (ее лизисе) и являются ее структурной частью, как, например, ЛПС, который представляет собой часть клеточной мембраны. Экзотоксины – вещества, которые образуются в результате жизнедеятельности клетки [4].

Молекула ЛПС включает в себя три компонента: полисахаридная цепь (О-антиген), олигосахарид кора (центральный олигосахарид) и липид А. Структура полисахаридной цепи крайне вариабельна среди разных видов грамотрицательных бактерий, в отличие от липида А, который является консервативной молекулой (рис. 1).

О-антиген состоит из повторяющихся звеньев сахаров в форме цепи, которые являются гидрофильными. Поскольку это самая внешняя часть молекулы ЛПС, она более доступна для связывания антител, чем центральные участки молекулы ЛПС. У *Enterobacteriaceae* (например, *Escherichia coli*) полисахарид варьируется по длине и составу в зависимости от штамма бактерий и придает штамму специфичность к О-антигену. Некоторые роды бактерий обладают менее совершенной структурой ЛПС. Например, О-специфическая антигенная цепь отсутствует у патогенов слизистой оболочки, таких как *Neisseria*, *Bordetella* и *Haemophilus*, а ЛПС этих родов содержат только коровый олигосахарид.

Коровый полисахарид представляет собой неповторяющуюся цепочку моносахаридных остатков в составе ЛПС. Основные компоненты включают остатки 3-дезоксидманно-окт-2-улозоновой кислоты, гептозы и различные гексозы, и коровый олигосахарид может подвергаться модификации с помощью фосфатов и фосфоэтаноламиновых групп. В нем так же выделяют внутренние и внешние области. У рода *Chlamydia* отсутствует внешняя область, а есть только внутренняя [5].

Липид А – гидрофобный компонент ЛПС, представляющий собой дисахарид, построенный из двух остатков глюкозамина, ацилированный цепями жирных кислот. Липид А состоит из диглюкозамина, двух фосфатов и шести ацильных цепей (жирных кислот). У «симметрично» ацелированного липида А каждый глюкозаминоый фрагмент содержит одинаковое количество ацильных цепей, у «асимметрично» ацелированного – разное, например липид А *E. coli*, 4 из 6 ацильных цепей которого переносятся первым глюкозамином. Две 3-гидроксимиристат (жирные кислоты) цепи присоединяются непосредственно к каждому из двух глюкозаминов (первичные цепи). К первичным цепям, через сложные эфирные связи с гидроксильными группами первичных цепей, присоединены вторичные («ответвляющиеся») цепи. Первичные (связанные с глюкозамином) ацильные цепи обычно содержат 12 атомов углерода. Жирными кислотами могут быть лаурат (C12), мирилат (C14), иногда пальмитат (C16), встречающиеся в качестве вторичной ацильной цепи. Эти ацильные цепи придают липиду А гидрофобные свойства, что делает его наиболее иммуногенной частью ЛПС [6].

Липид А встроен во внешнюю оболочку бактериальной мембраны посредством электростатических и, главным образом, гидрофобных взаимодействий. Здесь диглюкозами-

новая часть липида А направлена на внешнюю среду, в то время как ацильные цепи липида А – на гидрофильную внутреннюю часть мембраны [7].

Однако бактериальные патогены выработали сложные механизмы избегания, которые позволяют успешно преодолевать защитные реакции организма хозяина, предотвращая распознавание их липида А. Внутриклеточные патогены должны минимизировать распознавание для выживания во внутриклеточной нише, чтобы защитить бактерии от лизиса антимикробными соединениями [8]. Поэтому молекула ЛПС грамотрицательных бактерий, отличных от кишечной палочки, может содержать больше или меньше ацильных цепей, более длинные ацильные цепи, разветвленные ацильные цепи, ненасыщенные ацильные цепи, только один фосфат или другие модификации. Бактерии используют способы модификации липида А путем добавления остатков 4-аминоарабинозы (Ara4N) или этаноламина к фосфатным группам, удаления ацильных цепей или фосфатных групп [9] или удлинения или укорочения ацильных цепей, присутствующих в липиде А. Известно, что *Yersinia pestis* продуцирует иммунологически активный гексаацилированный липид А в организме промежуточного хозяина, блохи, и при температуре 21°C. Но при попадании бактерии в организм человека и повышении температуры тела до 37°C преобладает слабоиммуногенный тетраацилированный липид А. *Francisella tularensis* при температуре 37°C присоединяет более длинные ацильные цепи, чем при более низких температурах, что является существенной модификацией для повышения вирулентности [10]. Известно, что *Brucella abortus* дополняет остатки глюкозамина пиродифосфорилэтаноламином [11], а *Salmonella* может добавлять остатки Ara4N или этаноламин, удалять или добавлять ацильные цепи, а также гидроксिलировать их [12]. Общей чертой успешных грамотрицательных внутриклеточных патогенов является то, что они модифицируют липид А, и эта модификация может приводить к полной авирулентности.

Структура мономера липида А также определяет его молекулярную форму. Эти формы могут быть коническими или цилиндрическими в зависимости от соотношения между гидрофобными и гидрофильными участками. Наиболее эндотоксически активный мономер липида А имеет коническую структуру, в то время как менее активный мономер липида А – цилиндрическую. Активность эндотоксина может быть повышена с помощью обработки ультразвуком [13]. Биологическая значимость этих супрамолекулярных структур и относительная важность агрегатов ЛПС по сравнению с мономерами ЛПС для распознавания хозяина остаются неясными. При концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицелл, мономеры липида А агрегируют в надмолекулярные структуры, определяемые молекулярной формой липида А. Эти надмолекулярные структуры иногда достаточно велики, и их можно рассмотреть под электронным микроскопом.

Выделяют также две формы ЛПС: гладкая (S-форма) и шероховатая (R-форма). Гладкая форма – наиболее распространенная форма ЛПС, состоящая из трех компонентов: гидрофобного липида А, корового антигена и гидрофильного О-специфического полисахарида (О-ПС). Шероховатая форма отличается от гладкой отсутствием О-ПС [14].

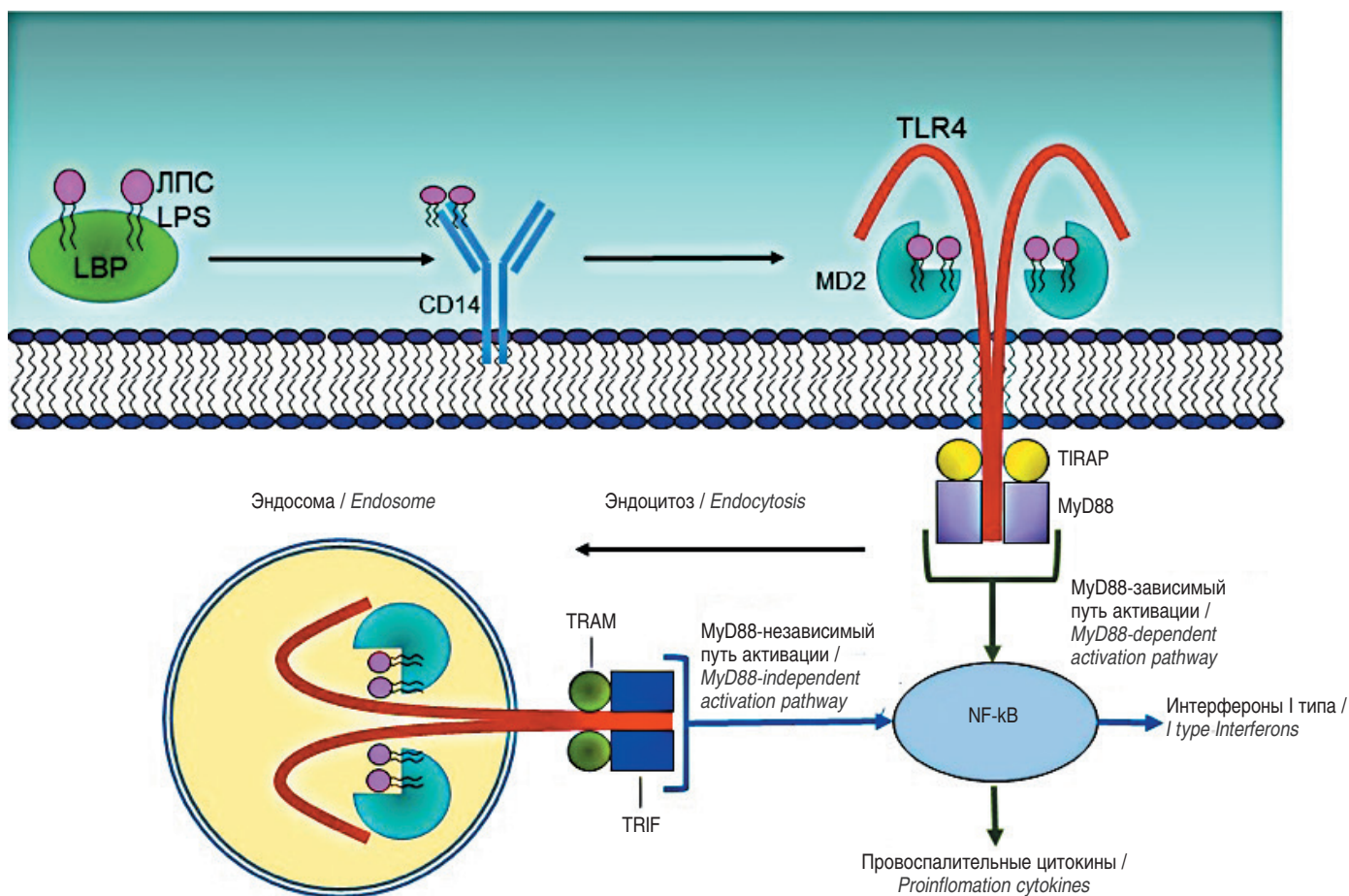


Рис. 2. Схематическое изображение сигнального пути ЛПС/Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) и механизма действия липида А: ЛПС-связывающий белок (LBP), ассоциированный с ЛПС (или липидом А), сначала переносится на CD14, а затем доставляется к миелоидному фактору дифференцировки 2 (MD2), обеспечивая образование ЛПС–MD2–TLR4, что приводит к димеризации рецепторов TLR4. Передача сигналов ЛПС/TLR4 включает внутриклеточное вовлечение адаптерного белка, содержащего домен рецептора Toll/IL-1 (TIRAP), адаптерную молекулу, связанную с TRIF (TRAM), миелоидный фактор дифференцировки 88 (MyD88) и домен рецептора Toll/IL-1, содержащий адаптерные домены, индуцирующие интерферон-β (TRIF). MyD88-зависимый путь способствует экспрессии провоспалительных цитокинов, MyD88-независимый путь опосредует индукцию интерферонов I типа [22].

Fig. 2. Scheme of the LPS/Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway and the lipid A mechanism of action: LPS-binding protein (LBP) associated with LPS (or lipid A) is first translocated to CD14 and then delivered to myeloid differentiation factor 2 (MD2), mediating the formation of LPS–MD2–TLR4, which leads to dimerization of TLR4 receptors. LPS/TLR4 signaling involves the intracellular recruitment of Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP), TRIF-related adaptor molecule (TRAM), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor domains inducing interferon-β (TRIF). The MyD88-dependent pathway promotes the expression of proinflammatory cytokines, while the MyD88-independent pathway mediates the induction of type I interferons [22].

Врожденный иммунитет и эндотоксическая толерантность на ЛПС

ЛПС участвует в процессах иммунопатогенеза при бактериальных инфекциях и как фактор вирулентности инициирует целый ряд защитных для клетки механизмов. Во-первых, ЛПС на поверхности бактерий образует непроницаемый для жидких сред барьер, который блокирует проникновение определенных антимикробных молекул [15]. Во-вторых, длинная и выступающая наружу часть О-ПС предотвращает связывание комплемента на поверхности S-форм бактерий, препятствуя распознаванию иммунной системой [16].

В то же время при попадании ЛПС в организм активируется как врожденный, так и адаптивный иммунитет.

Врожденный иммунитет на ЛПС является важной частью защитного механизма против грамотрицательных бактерий. Существует несколько путей его активации.

Наиболее изученным является TLR4-MD-2-путь активации. TLR4 и MD2 – рецепторы на клеточной мембране цело-

го ряда клеток иммунной системы и тканей по всему организму. С помощью по меньшей мере двух белков – ЛПС-связывающего белка (LBP) и кластера дифференцировки 14 (CD14) – TLR4 и MD-2 могут связываться с ЛПС, который находится вне клетки-хозяина (внеклеточный). Это связывание запускает серию молекулярных событий внутри клетки-хозяина, приводящих к транскрипции тысяч генов и продукции клеткой цитокинов и хемокинов. Ассоциированный с ЛПС-связывающим белком (LBP) ЛПС (с его липидом А) сначала доставляется на CD14. CD14 переносит ЛПС к эктодомену рецепторного комплекса миелоидного фактора дифференцировки 2 (MD2) и TLR4, обеспечивая образование тройного комплекса ЛПС-MD2-TLR4 [17]. Ацильные цепи липида А специфически взаимодействуют с гидрофобной областью MD2, в то время как дисахаридфосфатные группы электростатически и по водородным связям взаимодействуют с заряженными остатками в MD2 и TLR4, способствуя димеризации комплекса ЛПС-MD2-TLR4 [18]. Это, в свою

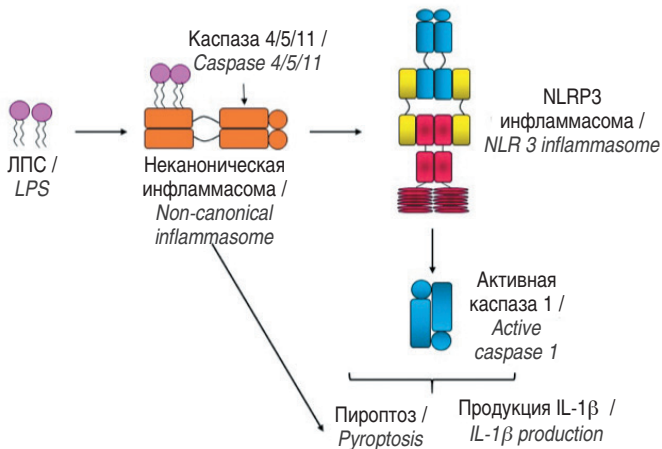


Рис. 3. Цитозольно-каспазный путь обнаружения ЛПС.

ЛПС, достигший цитозоля, связывается с каспазой 4/5/11, инициируя образование неканонической инфламмосомы и, в свою очередь, пироптоз. Активность каспазы 4/5/11 также стимулирует образование NLRP3 инфламмосомы, которая активирует процессинг и высвобождение интерлейкина-1 β (IL-1 β).

Fig. 3. Cytosolic-caspase pathway of LPS detection.

Reached cytosol LPS binds to caspase 4/5/11, initiating the formation of a non-canonical inflammasome and, in turn, pyroptosis. The activity of caspase 4/5/11 also stimulates the formation of NLRP3 inflammasome, which activates the processing and release of interleukin-1 β (IL-1 β).

очередь, приводит к димеризации внутриклеточных TIR-доменов TLR4 (TIR – Toll-интерлейкина-1 рецептор), запуская сигнальный путь ЛПС/TLR4 через два различных внутриклеточных каскада путем привлечения четырех адаптерных белков: MyD88; содержащий TIR-домен адаптерный белок (TIRAP; также известный как Mal); связанная с TRIF адаптерная молекула (TRAM) и Toll/IL-1 рецептор домен-содержащий адаптер, индуцирующий интерферон- β (IFN- β) (TRIF) [19]. MyD88-зависимый путь включает вовлечение TIRAP и MyD88 в домен TIR, что приводит к ранней активации NF- κ B, продукции провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (ФНО) и интерлейкин-1 β (IL-1 β), и Th1-ответу. TRIF/TRAM-зависимый путь включает CD14-опосредованную интернализацию TLR4/MD2 в эндосомы [20], что вызывает позднюю стадию активации NF- κ B с более низким уровнем провоспалительных цитокинов. Он также активирует транскрипционный фактор IRF3, который приводит к экспрессии IFN- β и IFN-индуцируемых генов и продукцией интерферонов I типа [21] (рис. 2).

Наряду с LBP и CD14 такие белки, как белок, связывающий липопротеины высокой плотности, и бактерицидный / повышающий проницаемость белок, свободно циркулирующие в крови млекопитающих, связывают ЛПС и могут доставлять его к рецепторному комплексу TLR4-MD-2 [23].

Существует также внутриклеточный путь обнаружения ЛПС – цитозольный каспазный путь. Цистеинпротеаза каспаза 4/5/11 является цитозольным рецептором для ЛПС. Попадая в клетку, ЛПС напрямую связывается с каспазой 4/5/11 через липид А, что приводит к ее олигомеризации, вызывая неканоническую активацию инфламмосомы. Активная неканоническая инфламмосома каспаза-4/5/11 активирует каноническую инфламмосому NLRP3, что индуцирует протеолиз и созревание прокаспазы-1 [24]. Это приводит к опосредованному каспазой 1 созреванию провос-

палительных цитокинов семейства IL-1 (IL-1 β и IL-18) [25], а также вызывает пироптоз и каспаза 1-зависимую гибель клеток [26] (рис. 3).

Активация врожденного иммунитета может как способствовать привлечению к патогену иммунных клеток или его разрушению, так и, за счет продукции провоспалительных цитокинов, вызывать негативные изменения на клеточном и организменном уровне (рис. 4).

Для регуляции активации в организме млекопитающих есть множество иммунных факторов, которые обнаруживают и ограничивают ЛПС. Система комплемента, состоящая из белков, и фермент ацилоксиацилгидролаза циркулируют в сыворотке крови и быстро связываются с молекулой ЛПС, а также расщепляют и/или изолируют ее соответственно [27].

Лактоферрин, экспрессируемый белыми кровяными клетками – нейтрофилами, связывает и модифицирует структуру ЛПС, нейтрализуя его и делая неиммуностимулирующим [28]. Эти факторы очень эффективны, и млекопитающие, как правило, способны очень быстро деградировать ЛПС, выводя сублетальные дозы ЛПС из крови в течение 30 мин [29]. Адаптация млекопитающих к ЛПС также включает сложную стратегию, известную как «толерантность к эндотоксинам». В условиях, когда организм постоянно подвергается воздействию низких доз ЛПС, существует риск его постоянного саморазрушения. Это повреждение может быть уменьшено путем изменения чувствительности иммунных клеток к ЛПС после первого воздействия. Низкие дозы ЛПС легко индуцируют у некоторых белых кровяных телец млекопитающих временную активацию или, реже, потенцирование реакции на последующие более высокие дозы молекулы [30].

О первых достоверных наблюдениях эндотоксической толерантности (ЭТ) сообщил Пол Бенсон в 1947 г., когда он индуцировал толерантность кроликов к ЛПС путем многократного введения им этого эндотоксина [31]. По его словам, «у животных, которые получали ежедневные инъекции пирогенов [ЛПС] в течение нескольких недель, не наблюдалось признаков ухудшения общего состояния здоровья. Они имели тенденцию к увеличению веса, их шерсть оставалась гладкой, и не было особой склонности к развитию интеркуррентных инфекций». Этот феномен также обнаруживался у людей, выздоравливающих после малярии, у которых наблюдалась ослабленная лихорадочная реакция при повторном введении эндотоксина [32]. В 1969 г. было продемонстрировано, что предварительное заражение живой сальмонеллой ослабляет воспалительную реакцию, вызванную эндотоксином или убитыми бактериями [33]. Однако до этого исследования были зафиксированы некоторые клинические примеры ЭТ у пациентов с пиелонефритом [34] и у тех, кто выздоравливал после брюшного тифа или паратифа [35]. Это подтверждало широкое распространение ЭТ среди людей. Исследования на мышах показали, что сублетальные дозы ЛПС обеспечивают защиту от последующих летальных исходов от ЛПС [36]. Показана определяющая роль моноцитов/макрофагов при ЭТ. Фактически как мышиные, так и человеческие моноциты/макрофаги демонстрируют сниженную воспалительную реакцию на воздействие эндотоксина, если они ранее подвергались воздействию эндотоксина [37].

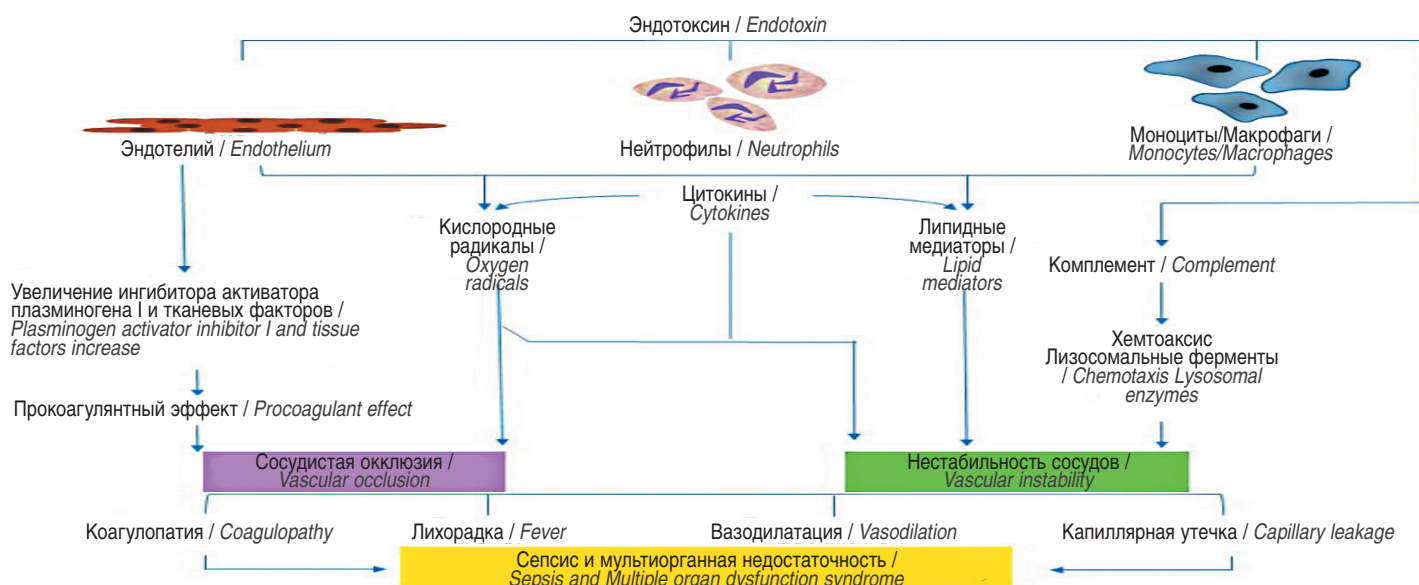


Рис. 4. Патогенез сепсиса.

Fig. 4. Sepsis pathogenesis.

В основе ЭТ лежат различные молекулярные механизмы. Мета-анализ наборов данных о лейкоцитах при сепсисе выявил строгую корреляцию между повышенными уровнями HIF1 α (фактор, индуцируемый гипоксией 1- α) и IRAK-M (киназа, ассоциированная с рецептором IL-1) в независимых группах пациентов с сепсисом, у которых наблюдались признаки ЭТ [38]. IRAK-M экспрессируется в ряде типов иммунных и эпителиальных клеток и, благодаря ингибированию выработки провоспалительных цитокинов, может регулировать иммунный гомеостаз и толерантность к ЛПС за счет ингибирования нисходящего сигнального пути TLR4 [39]. HIF1 α при ЭТ не только усиливает экспрессию IRAK-M в моноцитах, но и одновременно снижает выработку провоспалительных цитокинов и перепрограммирование моноцитов [40], что приводит к иммуносупрессивному фенотипу и усилению защитных функций, характерных для ЭТ, таких как фагоцитоз, антимикробная активность, и ремоделирование тканей [41]. Первоначально активация HIF1 α запускает провоспалительную программу, вызывающую мощный иммунный ответ. Однако хроническая активация приводит к переключению, вызывая действие негативных регуляторов, таких как IRAK-M, которые в конечном итоге ослабляют воспалительные реакции и приводят к иммуносупрессивному фенотипу. Этот сдвиг в сторону фенотипа иммуносупрессии имеет решающее значение для ЭТ. Кроме того, была описана экспрессия лиганда программируемой клеточной гибели-1 (PD-L1) во время ЭТ у пациентов с сепсисом [42]. HIF1 α перемещается в ядро и стимулирует экспрессию PD-L1 во время ЭТ в моноцитах человека [43]. Показано, что повторное воздействие эндотоксина перепрограммировало моноциты на уровне хроматина и 80% доступных участков стали более открытыми. Это приводило к изменению экспрессии генов, в первую очередь участвующих в детоксикации и реагирующих на повреждение клеток. Также путь NF- κ B/I κ B играет роль в регуляции экспрессии генов при ЭТ [44]. Наконец, микроРНК, короткие некодирующие молекулы РНК (~22 нуклеотида), являются важнейшими регуляторами

воспалительных реакций во время ЭТ. Многочисленные исследования показали, что в развитии ЭТ участвуют несколько микроРНК, включая miR-98, miR-125b, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-221, miR-222, miR-579 и семейство let-7 [45].

ЛПС-индуцированный адаптивный иммунитет

Гуморальный ответ (антитела) против ЛПС играет важную протективную роль в защите от грамотрицательной инфекции. ЛПС-специфические антитела являются ключевыми звеньями различных механизмов специфического иммунного ответа: инактивация эндотоксина, опсонизация, антителозависимая клеточная цитотоксичность, комплемент-опосредованный лизис и т.п. Например, у бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis* и *Salmonella enterica* защита обеспечивается за счет опсонофагоцитоза, комплемент-опосредованного лизиса и агглютинации [46]. Анти-ЛПС-IgG в слое слизи слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта могут сшиваться с муцином для захвата *Salmonella Typhimurium* на муциновой сетке, подавляя таким образом подвижность бактерий на основе жгутиков [47].

Значение ЛПС в развитии протективного иммунного ответа было показано еще в 1960-х гг. в опытах Braude. Он проводил заражение кроликов бактерией *E. coli*, вводя ее в коленный сустав. После чего животные развивали лихорадку и лейкоцитоз в отсутствие циркулирующих бактерий. Далее он вводил животным антитела против O-антигена ЛПС, что приводило к исчезновению лихорадки и лейкоцитоза. Braude заключил, что ЛПС из кишечной палочки в суставе попадает в кровоток, вызывая общие симптомы, и что антитела, направленные против эндотоксина, могут защитить животное [48]. Протективная роль ЛПС-специфических антител как у людей, так и у животных также продемонстрирована в ряде исследований. Иммунизация беременных коров вакциной, состоящей из детоксифицированного липоолигосахарида (ЛОС) из мутанта *E. coli* O111 R κ (J5), нековалентно связанного с белком внешней мембраны менингококка группы B (J5дЛОС/OMP), приводила к образованию

высокого уровня анти-J5-ЛОС-антител в молозиве. При пероральном введении полученного молозива крысам с нейтропенией, зараженным синегнойной палочкой, увеличивалась выживаемость по сравнению с неиммунными животными [49]. В эксперименте на мышах было выявлено, что предварительное введение моноклональных антител (МКА) против О-антигена *K. pneumoniae* ST258 защищало их от развития эндотоксического шока и заражения после последующего введения немодифицированного ЛПС и живых бактерий соответственно [50]. Введение пациентам с бактериемией сыворотки, полученной в результате иммунизации здоровых добровольцев мутантным штаммом *E. coli* J5, приводило к снижению смертности [51].

В настоящее время в клинической практике широко используются иммуноглобулины для внутривенного введения для адьювантной терапии сепсиса у человека [52]. Отмечено, что наибольшую эффективность имеют антитела класса IgM. Содержание специфических анти-ЛПС-IgM-антител в Пентаглобине – иммунобиологическом препарате, который успешно используется для лечения сепсиса, в несколько раз превышает содержание IgG [53]. Отмечено, что вероятность прогрессирования сепсиса в септический шок выше у тех пациентов, у которых меньше IgM-антител [54].

О-полисахарид является одним из основных антигенов на который развивается протективный иммунный ответ. Введение мышам МКА против О-антигена *S. Typhimurium*, защищало их заражения вирулентными штаммами этой бактерии [55]. Липид А и коровий антиген представляют собой консервативные участки ЛПС и не сильно отличаются между различными клинически значимыми видами бактерий, что могло бы быть перспективной альтернативой для нейтрализации ЛПС независимо от серотипа. Кроме того, структурное сходство молекул липида А почти у всех грамотрицательных бактерий [56] побудило исследователей к созданию и изучению перекрестных реакций и защитных эффектов антител к липиду А [57]. Эти попытки потерпели неудачу, поскольку эпитопы, которые связываются этими антителами, недоступны в ЛПС бактерий дикого типа из-за их маскировки коровым полисахаридом и О-полисахаридом [58].

Нейтрализующий эффект специфичных к О-антигену антител слабее у инкапсулированных бактерий, таких как некоторые серотипы *K. pneumoniae*, т.к. капсула снижает доступность антител к ЛПС [59].

Доклинические и клинические исследования вакцин против септического шока

Вакцины на основе детоксицированного бактериального ЛПС широко используются в клинической практике для предотвращения распространения бактериальных инфекций [60], что дает основание для создания вакцин против септического шока. В ряде исследований показана возможность профилактики развития септического шока на лабораторных животных с помощью ЛПС патогенных бактерий. Была разработана крысиная модель с нейтропенией для изучения активной инфекции, вызванной синегнойной палочкой. Животным внутривенно вводили нейтральные МКА (группа 1); анти-ФНО-МКА (группа 2); МКА против ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* (группа 3) или комбинацию анти-ФНО- и анти-ЛПС-МКА (группа 4), далее заражали живот-

ных синегнойной палочкой. Ни одно из контрольных животных в группе 1 не пережило 7-дневный период нейтропении (0/16). Напротив, выживаемость составила 44% во 2-й группе ($p < 0,02$), 37% – в 3-й ($p < 0,05$) и 75% – в 4-й ($p < 0,0002$). Комбинация МКА обеспечивала большую защиту, чем любое из МКА, вводимых по отдельности ($p < 0,05$). Эти результаты указывают на то, что комбинация МКА к ЛПС и ФНО обладает дополнительным преимуществом при экспериментальном синегнойном сепсисе [61]. В другом эксперименте пассивное введение антител, полученных у кроликов на ковалентно-связанный детоксицированный ЛПС *E. coli* J5 с белковым комплексом внешней мембраны менингококка группы В, защищала крыс с нейтропенией от гетерологичной летальной грамотрицательной бактериальной инфекции (синегнойная палочка и *K. pneumoniae*). Эта вакцина вызывала более чем 200-кратное увеличение уровня антител к ЛПС *E. coli* J5, который оставался повышенным на протяжении всей нейтропении, вызванной циклофосфамидом, и в течение <3 мес. Выживаемость среди иммунизированных животных была выше, чем у контрольных: 48% (13/28) против 7% (2/29) у крыс, зараженных синегнойной палочкой; 61% (11/18) против 0% (0/10) у крыс, получавших синегнойную палочку и цефтазидим; 64% (9/14) против 13% (2/15) у крыс, зараженных клебсиеллой. У иммунизированных животных было более низкое содержание бактерий в органах и более низкий уровень циркулирующего эндотоксина в начале лихорадки. Кроме того, активная иммунизация антиэндотоксиновой вакциной улучшила выживаемость животных с ослабленным иммунитетом после заражения более чем 2 гетерологичными клинически значимыми видами бактерий [62]. Далее было изучено протективное действие комбинации антител – МКА к ЛПС *P. aeruginosa* (синегнойная палочка), поликлональная антисыворотка к ЛПС *E. coli* J5 и МКА, направленные против ФНО- α . Комбинация всех трех иммунотерапевтических средств привела к 77%-й выживаемости (33 из 43 животных). Этот уровень защиты был выше, чем при любой комбинации лечения двумя МКА (выживаемость 50–60%; $p = 0,029$) или при лечении одним МКА (выживаемость 25–43%; $p < 0,001$) и по сравнению с контрольной группой (0/25 выживших; $p < 0,0001$) [63].

В наших исследованиях из энтеробактерии *Shigella sonnei* был получен новый природный вариант цвиттерионного полисахарида – экзополисахарид (ЭПС), в состав которого входит липидный компонент, представляющий собой диацилглицерофосфат, а повторяющееся звено идентично с таковым О-специфичного полисахарида *S. sonnei*. Препарат ЭПС отличался высокой степенью безопасности: не вызывал пирогенной реакции у крыс и гибели мышей при введении в сверхвысокой дозе (1 г/кг животного). При профилактической иммунизации ЭПС отмечены замедление развития экспериментального перитонита и продление времени выживаемости мышей (СВА \times С57В1/6)F1 при развитии септического процесса. При предварительном введении препарат также эффективно обеспечивал выживаемость мышей от эндотоксического шока и подавлял продукцию ФНО- α при нагрузке бактериальным эндотоксином *E. coli* O:55 в дозе 150 мг/кг [64].

Также нами было показано, что ЛПС *S. sonnei* при профилактическом введении обеспечивал задержку развития

экспериментального перитонита, индуцированного методом прокола и перевязки слепой кишки (CLP-модель), защищая мышей от гибели на ранних стадиях после CLP (до 5 дней после CLP) [65].

Несомненный интерес представляют клинические исследования некоторых поливалентных кандидатных вакцинных препаратов. Пациенты с тупыми и проникающими травмами были иммунизированы против *K. pneumoniae* и *Pseudomonas* через 72 ч после ранения. Использовались 24-валентная вакцина против *K. pneumoniae* на основе капсульного полисахарида и 8-валентная вакцина против *Pseudomonas*, представляющая собой конъюгат О-антигена бактерии с токсином А. На 14-й и 28-й дни после иммунизации у всех пациентов наблюдался более чем четырехкратный ответ по меньшей мере на 6 из 9 антигенов вакцины против *P. aeruginosa*: половина пациентов ответила на 8 из 9 антигенов. 9 пациентов реагировали по меньшей мере на 18 из 24 антигенов клебсиеллы, а 7 пациентов – на 22 из 24 антигенов [66].

Для профилактики сепсиса с помощью активной или пассивной иммунопрофилактики были разработаны вакцина против клебсиеллы, состоящая из 24 капсульных полисахаридных антигенов, и вакцина против синегнойной палочки *P. aeruginosa*, состоящая из 8 О-полисахаридных антигенов, конъюгированных с токсином А синегнойной палочки. Обе вакцины были введены одновременно в разные руки (20 добровольцев) или с интервалом в 14 дней (21 доброволец). Вакцины одинаково хорошо переносились обеими группами добровольцев. Средние геометрические концентрации антител и среднее кратное повышение уровня антител к 33 вакцинным антигенам (включая токсин А) были одинаковыми в обеих группах через 2 мес., снижение уровня антител, измеренное через 18 мес., также было сходным [67].

Исследована вакцина, состоящая из детоксифицированного ЛПС *E. coli* O111:B4 (мутант J5), нековалентно связанного с белком внешней мембраны менингококка группы В (OMP). 20 здоровых взрослых пациентов через 0, 29 и 59 дней получили 3 дозы антигена (10 мкг дЛПС) с СРГ 7909 (250 или 500 мкг) или без него. Все вакцинные препараты хорошо переносились без каких-либо местных или системных осложнений, превышающих среднюю степень тяжести. Только в группе, получавшей вакцину, был достигнут более чем 4-кратный «ответный» уровень антител IgG и IgM у одного из 6 пациентов. В отличие от этого в группах, получавших вакцину плюс СРГ 7909, наблюдались более ранние и устойчивые (до 180 дней) реакции, более значительное увеличение среднего показателя и более высокая доля «ответивших», достигших увеличения более чем в 4 раза по сравнению с исходным уровнем; вакцина J5dLPS/OMP, с адьювантом СРГ или без него, была безопасной и хорошо переносилась. Введение СРГ увеличило число пациентов с более чем 4-кратным повышением уровня антител [68].

Таким образом, к настоящему времени хорошо изучено и охарактеризовано строение молекулы ЛПС грамотрицательных бактерий. Исследованы патогенетические механизмы ЛПС при его попадании в организм млекопитающих. Созданы биотехнологические платформы получения вакцин против различных бактериальных инфекций на основе ЛПС. Такого типа вакцины широко применяются в клинической практике. Доклинические исследования кандидатных антигенов на ла-

бораторных животных показали их способность предотвращать развитие сепсиса. Все это дает предпосылки для создания эффективных вакцин против септического шока.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
2. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B; CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jul 15;168(2):165-72. DOI: 10.1164/rccm.2201087
3. Opal SM. Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib Nephrol*. 2010;167:14-24. DOI: 10.1159/000315915
4. Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC. Lipopolysaccharide nomenclature – past, present, and future. *J Bacteriol*. 1986 Jun;166(3):699-705. DOI: 10.1128/jb.166.3.699-705.1986
5. Raetz CR. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol*. 1993 Sep;175(18):5745-53. DOI: 10.1128/jb.175.18.5745-5753.1993
6. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. 2018 Aug;8(1):10.1128/ecosalplus. ESP-0001-2018. DOI: 10.1128/ecosalplus. ESP-0001-2018
7. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635-700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
8. Band VI, Weiss DS. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2015 Mar;4(1):18-41. DOI: 10.3390/antibiotics4010018
9. MacArthur I, Jones JW, Goodlett DR, Ernst RK, Preston A. Role of pagL and lpxO in *Bordetella bronchiseptica* lipid A biosynthesis. *J Bacteriol*. 2011 Sep;193(18):4726-35. DOI: 10.1128/JB.01502-10
10. Montminy SW, Khan N, McGrath S, Walkowicz MJ, Sharp F, Conlon JE, et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat Immunol*. 2006 Oct;7(10):1066-73. DOI: 10.1038/ni1386
11. Casabuono AC, Czibener C, Del Giudice MG, Valguarnera E, Ugalde JE, Couto AS. New Features in the Lipid A Structure of *Brucella suis* and *Brucella abortus* Lipopolysaccharide. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017 Dec;28(12):2716-2723. DOI: 10.1007/s13361-017-1805-x
12. Kawasaki K, Manabe T. Latency of the lipid A deacylase PagL is involved in producing a robust permeation barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*. 2010 Nov;192(21):5837-40. DOI: 10.1128/JB.00758-10
13. Komuro T, Murai T, Kawasaki H. Effect of sonication on the dispersion state of lipopolysaccharide and its pyrogenicity in rabbits. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1987 Dec;35(12):4946-52. DOI: 10.1248/cpb.35.4946
14. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 May;2(5):a000414. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414
15. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):593-656. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003

16. Goebel EM, Wolfe DN, Elder K, Stibitz S, Harvill ET. O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1774-80. DOI: 10.1128/IAI.01629-07
17. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013 Dec 6;45(12):e66. DOI: 10.1038/emm.2013.97
18. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1191-5. DOI: 10.1038/nature07830
19. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637-50. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.006
20. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*. 2008 Apr;9(4):361-8. DOI: 10.1038/ni1569
21. Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, Kriegshäuser G, Baccarini M, Donabauer B, et al. Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):471-7. DOI: 10.1038/ni910
22. Pifferi C, Fuentes R, Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat Rev Chem*. 2021;5(3):197-216. DOI: 10.1038/s41570-020-00244-3
23. Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol*. 1998 Jul;64(1):14-8. DOI: 10.1002/jlb.64.1.14
24. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. 2014 Oct 9;514(7521):187-92. DOI: 10.1038/nature13683
25. Kieser KJ, Kagan JC. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jun;17(6):376-390. DOI: 10.1038/nri.2017.25
26. Gurung P, Malireddi RK, Anand PK, Demon D, Vande Walle L, Liu Z, et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. *J Biol Chem*. 2012 Oct 5;287(41):34474-83. DOI: 10.1074/jbc.M112.401406
27. Staab JF, Fosmire S, Zhang M, et al. Distinctive structural features are shared by human, lapine, and murine acyloxyacyl hydrolases. *J Endotoxin Res*. 1999;5:205-208. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/09680519990050040701>
28. André J, Lohner K, Blondelle SE, Jerala R, Moriyon I, Koch MH, et al. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochem J*. 2005 Jan 1;385(Pt 1):135-43. DOI: 10.1042/BJ20041270
29. Shi Q, Cox LA, Glenn J, Tejero ME, Hondara V, Vandeberg JL, et al. Molecular pathways mediating differential responses to lipopolysaccharide between human and baboon arterial endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Feb;37(2):178-84. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2009.05260.x
30. Escoll P, del Fresno C, García L, Vall s G, Lend nez MJ, Arnalich F, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 14;311(2):465-72. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.10.019
31. Beeson PB; Technical Assistance of Elizabeth Roberts. Tolerance to bacterial pyrogens: I. Factors influencing its development. *J Exp Med*. 1947 Jun 30;86(1):29-38. DOI: 10.1084/jem.86.1.29
32. Perry JA, Olver CS, Burnett RC, Avery AC. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):5921-5. DOI: 10.4049/jimmunol.174.10.5921
33. Greisman SE, Hornick RB, Wagner HN Jr, Woodward WE, Woodward TE. The role of endotoxin during typhoid fever and tularemia in man. IV. The integrity of the endotoxin tolerance mechanisms during infection. *J Clin Invest*. 1969 Apr;48(4):613-29. DOI: 10.1172/JCI106020
34. McCabe WR. Endotoxin tolerance. II. Its occurrence in patients with pyelonephritis. *J Clin Invest*. 1963 May;42(5):618-25. DOI: 10.1172/JCI104752
35. Neva FA, Morgan HR. Tolerance to the action of endotoxins of enteric bacilli in patients convalescent from typhoid and paratyphoid fevers. *J Lab Clin Med*. 1950 Jun;35(6):911-22.
36. Rojas A, Padr n J, Caveda L, Palacios M, Moncada S. Role of nitric oxide pathway in the protection against lethal endotoxemia afforded by low doses of lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Mar 15;191(2):441-6. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1237
37. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006;10(5):233. DOI: 10.1186/cc5055
38. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernández-Jiménez E, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):484-98. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.001
39. Mendoza-Barber  E, Corral-Rodríguez MA, Soares-Schanoski A, Velarde M, Macieira S, Messerschmidt A, et al. Contribution of globular death domains and unstructured linkers to MyD88-IRAK-4 heterodimer formation: an explanation for the antagonistic activity of MyD88s. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 27;380(1):183-7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.069
40. Kim HG, Kim NR, Gim MG, Lee JM, Lee SY, Ko MY, et al. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2553-61. DOI: 10.4049/jimmunol.180.4.2553
41. Avendaño-Ortiz J, Lozano-Rodríguez R, Martín-Quir s A, Maroun-Eid C, Terr n-Arcos V, Montalb n-Hernández K, et al. SARS-CoV-2 Proteins Induce Endotoxin Tolerance Hallmarks: A Demonstration in Patients with COVID-19. *J Immunol*. 2021 Jul 1;207(1):162-174. DOI: 10.4049/jimmunol.2001449
42. Avendaño-Ortiz J, Maroun-Eid C, Martín-Quir s A, Toledano V, Cubillos-Zapata C, Gómez-Campelo P, et al. PD-L1 Overexpression During Endotoxin Tolerance Impairs the Adaptive Immune Response in Septic Patients via HIF1 α . *J Infect Dis*. 2018 Jan 17;217(3):393-404. DOI: 10.1093/infdis/jix279
43. Kox M, de Kleijn S, Pompe JC, Ramakers BP, Netea MG, van der Hoeven JG, et al. Differential *ex vivo* and *in vivo* endotoxin tolerance kinetics following human endotoxemia. *Crit Care Med*. 2011 Aug;39(8):1866-70. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182190d5d
44. Chen X, Yoza BK, El Gazzar M, Hu JY, Cousart SL, McCall CE. RelB sustains IkappaBalpha expression during endotoxin tolerance. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Jan;16(1):104-10. DOI: 10.1128/CI.00320-08
45. Tongaonkar P, Trinh KK, Ouellette AJ, Selsted ME. Inhibition of miR-146a Expression and Regulation of Endotoxin Tolerance by Rhesus Theta-Defensin-1. *Mediators Inflamm*. 2023 Apr 17;2023:8387330. DOI: 10.1155/2023/8387330
46. Plested JS, Ferry BL, Coull PA, Makepeace K, Lehmann AK, MacKinnon FG, et al. Functional opsonic activity of human serum antibodies to inner core lipopolysaccharide (galE) of serogroup B meningococci measured by flow cytometry. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):3203-13. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3203-3213.2001
47. Schroeder HA, Newby J, Schaefer A, Subramani B, Tubbs A, Gregory Forest M, et al. LPS-binding IgG arrests actively motile *Salmonella Typhimurium* in gastrointestinal mucus. *Mucosal Immunol*. 2020 Sep;13(5):814-823. DOI: 10.1038/s41385-020-0267-9
48. Braude AI, Jones JL, Douglas H. The behavior of *Escherichia coli* endotoxin (somatic antigen) during infectious arthritis. *J Immunol*. 1963 Feb;90:297-311.
49. Cross AS, Opal SM, Palardy JE, Shridhar S, Baliban SM, Scott AJ, et al. A pilot study of an anti-endotoxin Ig-enriched bovine colostrum to prevent experimental sepsis. *Innate Immun*. 2021 Apr;27(3):266-274. DOI: 10.1177/17534259211007538
50. Szi jart  V, Guachalla LM, Hartl K, Varga C, Badarau A, Mirkina I, et al. Endotoxin neutralization by an O-antigen specific monoclonal antibody: A potential novel

- therapeutic approach against *Klebsiella pneumoniae* ST258. Virulence. 2017 Oct 3;8(7):1203-1215. DOI: 10.1080/21505594.2017.1279778
51. Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, Glauser MP, Sadoff JC, Douglas H, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. N Engl J Med. 1982 Nov 11;307(20):1225-30. DOI: 10.1056/NEJM198211113072001
52. Шуматов ВБ, Лазанович ВА, Павлов ВА, Ермакова НД, Просокова ЕВ. Внутривенные иммуноглобулины в адьювантной терапии сепсиса. Тихоокеанский медицинский журнал. 2017;2:42-45. / Shumatov VB, Lazanovich VA, Pavlov VA, Ermakova ND, Proseceva EV. Intravenous immunoglobulins as adjuvant therapy in patients with sepsis. Pacific Medical Journal. 2017;2:42-45. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.2.42-45 (In Russian).
53. Trautmann M, Held TK, Susa M, Karajan MA, Wulf A, Cross AS, et al. Bacterial lipopolysaccharide (LPS)-specific antibodies in commercial human immunoglobulin preparations: superior antibody content of an IgM-enriched product. Clin Exp Immunol. 1998 Jan;111(1):81-90. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1998.00445.x
54. Giamarellos-Bourboulis EJ, Apostolidou E, Lada M, Perdios I, Gatselis NK, Tsangaris I, et al. Hellenic Sepsis Study Group. Kinetics of circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. Crit Care. 2013 Oct 21;17(5):R247. DOI: 10.1186/cc13073
55. Colwell DE, Michalek SM, Briles DE, Jirillo E, McGhee JR. Monoclonal antibodies to *Salmonella* lipopolysaccharide: anti-O-polysaccharide antibodies protect C3H mice against challenge with virulent *Salmonella Typhimurium*. J Immunol. 1984 Aug;133(2):950-7.
56. Zähringer U, Lindner B, Rietschel ET. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. Adv Carbohydr Chem Biochem. 1994;50:211-76.
57. Olsthoorn MM, Petersen BO, Schlecht S, Haverkamp J, Bock K, Thomas-Oates JE, et al. Identification of a novel core type in *Salmonella* lipopolysaccharide. Complete structural analysis of the core region of the lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* sv. Arizonae O62. J Biol Chem. 1998 Feb 13;273(7):3817-29. DOI: 10.1074/jbc.273.7.3817
58. Brade L, Engel R, Christ WJ, Rietschel ET. A nonsubstituted primary hydroxyl group in position 6' of free lipid A is required for binding of lipid A monoclonal antibodies. Infect Immun. 1997 Sep;65(9):3961-5. DOI: 10.1128/iai.65.9.3961-3965.1997
59. Clements A, Jenney AW, Farn JL, Brown LE, Deliyannis G, Hartland EL, et al. Targeting subcapsular antigens for prevention of *Klebsiella pneumoniae* infections. Vaccine. 2008 Oct 16;26(44):5649-53. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.100
60. Абрамцева МВ, Неманова ЕО, Алехина НС. Перспективные направления разработки вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2022;22(3):249-265. / Abramtseva MV, Nemanova EO, Alekhina NS. Promising directions for vaccine development to prevent shigellosis. Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2022;22(3):249-265. DOI: 10.30895/2221-996X-2022-22-3-249-265 (In Russian).
61. Opal SM, Cross AS, Sadoff JC, Collins HH, Kelly NM, Victor GH, et al. Efficacy of antilipopolysaccharide and anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. J Clin Invest. 1991 Sep;88(3):885-90. DOI: 10.1172/JCI115390
62. Cross AS, Opal SM, Warren HS, Palardy JE, Glaser K, Parejo NA, et al. Active immunization with a detoxified *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide group B meningococcal outer membrane protein complex vaccine protects animals from experimental sepsis. J Infect Dis. 2001 Apr 1;183(7):1079-86. DOI: 10.1086/319297
63. Cross AS, Opal SM, Palardy JE, Bodmer MW, Sadoff JC. The efficacy of combination immunotherapy in experimental *Pseudomonas* sepsis. J Infect Dis. 1993 Jan;167(1):112-8. DOI: 10.1093/infdis/167.1.112
64. Маркина АА, Львов ВЛ, Апарин ПГ. Коррекция септического и эндотоксического шока при иммунизации цвиттерийным экзополисахаридом *Shigella sonnei*, фаза 1. Иммунология, 2013;34(1):39-42. / Markina AA, Lvov VL, Aparin PG. Correction of septic and endotoxic shock when immunization zwitterionic exopolysaccharides *Shigella sonnei*, phase 1. 2013;34(1):39-42. (In Russian).
65. Маркина АА, Апарин ПГ. Современные подходы к терапии и профилактике эндотоксического и септического шока. Физиология и патология иммунной системы. 2015;19(8):3-14. / Markina AA, Aparin PG. Modern approaches to therapy and prevention of endotoxic and septic shock. Physiology and Pathology of the Immune System. 2015;19(8):3-14. (In Russian).
66. Campbell WN, Hendrix E, Cryz S Jr, Cross AS. Immunogenicity of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent *Pseudomonas* O-polysaccharide conjugate vaccine administered to victims of acute trauma. Clin Infect Dis. 1996 Jul;23(1):179-81. DOI: 10.1093/clinids/23.1.179
67. Edelman R, Taylor DN, Wasserman SS, McClain JB, Cross AS, Sadoff JC, et al. Phase 1 trial of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent *Pseudomonas* O-polysaccharide conjugate vaccine administered simultaneously. Vaccine. 1994 Nov;12(14):1288-94. DOI: 10.1016/s0264-410x(94)80054-4
68. Cross AS, Greenberg N, Billington M, Zhang L, DeFilippi C, May RC, et al. Phase 1 testing of detoxified LPS/group B meningococcal outer membrane protein vaccine with and without synthetic CPG 7909 adjuvant for the prevention and treatment of sepsis. Vaccine. 2015 Nov 27;33(48):6719-26. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.10.072

Информация о соавторах:

Науменко Олеся Игоревна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории углеводов и бицидов им. академика Н.К.Кочеткова Института органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН

Алхазова Биана Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Стряхнин Пётр Алексеевич, лаборант лаборатории полисахаридных вакцин отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Кожина Елена Вадимовна, научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Головина Марина Эдуардовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией полисахаридных вакцин отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Information about co-authors:

Olesya I. Naumenko, PhD in Chemical Sciences, laboratory of carbohydrates and biocides academician N.K.Kochetkov, N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Science

Biana I. Alkhazova, junior scientist of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Petr A. Stryakhnin, technician of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Elena V. Kozhinova, scientific researcher of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Marina E. Golovina, PhD in Biological Sciences, of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Petr G. Aparin, MD, PhD, DSc, head of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Респираторный микробиом при муковисцидозе

М.В.Фурсов¹, Е.Е.Пославская¹, Н.А.Сухаричева¹, Р.У.Кагазежев², А.Ю.Лебедева¹, С.А.Красовский²

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

²ФГБУ «НИИ пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация

Дыхательная недостаточность, вызванная рецидивирующими легочными инфекциями у людей с муковисцидозом (МВ), остается основной причиной смертности в данной популяции пациентов. Инфекции, вызванные такими патогенами, как *Pseudomonas aeruginosa*, метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* и представители комплекса *Burkholderia cepacia*, ассоциированы с плохими клиническими исходами, включая ускоренное снижение функции легких и летальный исход. Кроме того, и другие микроорганизмы, такие как анаэробы, вирусы и грибы, все чаще признаются потенциальными факторами развития инфекций при МВ. Целью данного обзора является обобщение эпидемиологии и патогенеза наиболее распространенных видов бактерий, грибов и вирусов, инфицирующих дыхательные пути пациентов с МВ.

Ключевые слова: муковисцидоз, микробиология, бактерии, грибки, вирусы, микробиом

Для цитирования: Фурсов М.В., Пославская Е.Е., Сухаричева Н.А., Кагазежев Р.У., Лебедева А.Ю., Красовский С.А. Респираторный микробиом при муковисцидозе. Бактериология. 2024; 9(4): 130–138. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-130-138

Respiratory microbiome in cystic fibrosis

M.V.Fursov¹, E.E.Poslavskaya¹, N.A.Sukharicheva¹, R.U.Kagazezhev², A.U.Lebedeva¹, S.A.Krasovsky²

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

²Research Institute of Pulmonology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Respiratory failure secondary to recurrent pulmonary infections of individuals with cystic fibrosis (CF) remains the leading cause of mortality in this patient population. Certain pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and species of the *Burkholderia cepacia* complex continue to be associated with poorer clinical outcomes including accelerated lung function decline and increased mortality. In addition, other organisms such as anaerobes, viruses, and fungi are increasingly recognized as potential contributors to disease progression. The aim of this review is to summarize the epidemiology and pathogenesis of the most common bacterial, fungal, and viral species infecting the airways of CF patients.

Key words: cystic fibrosis, microbiology, bacteria, fungi, viruses, microbiome

For citation: Fursov M.V., Poslavskaya E.E., Sukharicheva N.A., Kagazezhev R.U., Lebedeva A.U., Krasovsky S.A. Respiratory microbiome in cystic fibrosis. Bacteriology. 2024; 9(4): 130–138. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-130-138

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз – это моногенное аутосомно-рецессивное генетическое заболевание, которым страдают >160 тыс. человек в мире, ограничивающее продолжительность жизни, наиболее распространенное в Европе, Северной Америке и Австралии [1, 2]. МВ обусловлен мутациями в локализованном на длинном плече 7-й хромосомы гене регулятора трансмембранной проводимости *CFTR*, кодирующем эпителиальный ионный

канал, который в норме транспортирует хлориды и бикарбонаты [3]. *CFTR* работает в тандеме с другими ионными каналами, включая эпителиальный натриевый канал (ENaC). Вместе эти каналы поддерживают гомеостаз объема и pH жидкости на поверхности эпителия дыхательных путей, что необходимо для правильного формирования, увлажнения и вискоэластичности слизи дыхательных путей, что, в свою очередь, имеет решающее значение для

Для корреспонденции:

Фурсов Михаил Васильевич, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 20.11.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Mikhail V. Fursov, Senior Researcher, Department of Cultures Collection, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: fursov@obolensk.org

The article was received 20.11.2024, accepted for publication 25.12.2024

эффективного мукоцилиарного клиренса, основного защитного механизма легких [4].

Классический МВ характеризуется хронической легочной инфекцией и воспалением, экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, мужским бесплодием и может включать в себя несколько сопутствующих заболеваний, таких как диабет, связанный с МВ, или заболевание печени, связанное с МВ. У большинства людей с МВ развивается хроническое нейтрофильное воспаление, связанное с высокими, неконтролируемыми уровнями сериновых протеаз, производимых нейтрофилами, включая эластазу нейтрофилов, катепсин G и протеиназу 3, что приводит к развитию

бронхоэктазии – прогрессирующего респираторного заболевания, характеризующегося структурным повреждением легких и необратимым расширением дыхательных путей [5].

CFTR-мутации вызывают радикальные изменения функционирования большинства желез внешней секреции. Вязкость выделяемых секретов увеличивается в несколько раз, что значительно усложняет их эвакуацию [6]. Кроме того, в полимерной сетке образующихся слизистых секретов значительно уменьшается размер пор. Их диаметр составляет $\leq 0,1$ мк, что в 10 раз меньше нормы. Через такую полимерную сетку у МВ-пациентов нейтрофилы практически не могут перемещаться и обеспечивать защиту от бактерий.

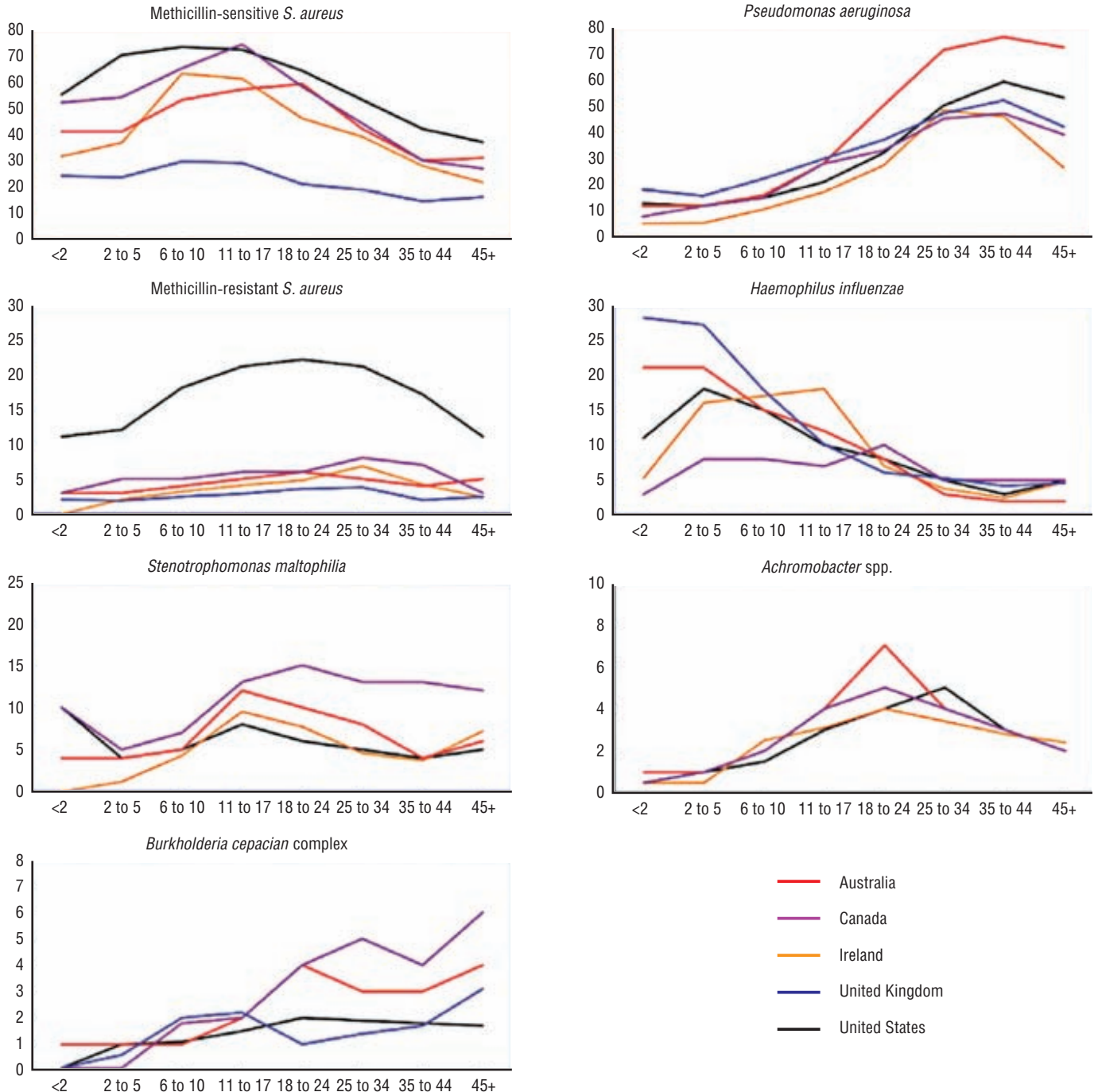


Рис. 1. Инфекции, вызванные бактериальными патогенами в дыхательной системе пациентов с МВ разных возрастных групп в 2020 г. в Великобритании, Канаде, Австралии и США [11].

Fig. 1. Infections caused by bacterial pathogens in the respiratory system of CF patients of different age groups in 2020 in the UK, Canada, Australia and the USA [11].

Это дает возможность анаэробам (облигатным и факультативным) формировать биопленки на эпителии дыхательных путей [7]. Есть еще одна существенная причина уменьшения антимикробной активности клеток иммунной системы больных МВ. У пациентов с кистозным фиброзом нарушения в функционировании гена *CFTR* имеют место и в нейтрофилах. В результате их фагоцитарная активность значительно ослаблена [8].

Во многих регионах мира МВ диагностируется на основании скрининга новорожденных, в то время как в других регионах диагноз основывается на регистрации мультиорганных клинических проявлений, повышенной концентрации хлоридов в поте или выявлении мутаций в гене *CFTR*. В некоторых случаях заболевание трудно диагностируется из-за того, что у пациента поражается только один орган и сохраняется остаточная функция белка CFTR, кодируемого геном, который рассматривается как генный вариант. Стратегии лечения МВ основаны на увеличении мукоцилиарного клиренса и активном лечении инфекций, что улучшает качество и увеличивает продолжительность жизни людей с МВ. Однако восстановление функции CFTR с помощью новых низкомолекулярных препаратов-модуляторов изменяет течение заболевания у многих пациентов. В рамках клинических испытаний активно изучаются многие другие подходы, необходимость в которых будет возрастать по мере улучшения показателей выживаемости и увеличения популяции взрослых с МВ [9].

Терминальная стадия заболевания легких является основной причиной смерти у людей с МВ, при этом для сохранения жизни требуется пересадка легких. После трансплантации необходимы препараты, предотвращающие отторжение, однако эти препараты снижают иммунный ответ и повышают восприимчивость к бактериальным инфекциям. Примерно 30% смертей, связанных с МВ, приходится на осложнения, вызванные инфекциями после трансплантации легких [10].

Люди, живущие с МВ, подвержены стойким бактериальным инфекциям легких. Микробиом дыхательных путей при МВ меняется в зависимости от возраста и стадии заболевания. В раннем детстве респираторные инфекции у пациентов с МВ чаще всего вызывает *Staphylococcus aureus*, а в зрелом возрасте доминирующим возбудителем (70% пациентов) становится *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 1) [11].

Лечение инфекций множественными курсами антибиотиков обычно приводит к развитию резистентности у их возбудителей, и в настоящее время распространенность резистентности среди патогенов при МВ достигает 67% [12]. Модуляторы CFTR неэффективны в борьбе с антибиотикорезистентными возбудителями инфекций при МВ, при этом респираторные инфекции остаются основной причиной дыхательной недостаточности и ранней смертности у людей с МВ, с дальнейшим развитием антибиотикорезистентности повышается риск неблагоприятных исходов заболевания [13]. Высоким уровнем устойчивости к антимикробным препаратам и смертельных исходов характеризуются при МВ инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *Burkholderia cepacia* complex.

Такие инфекции трудно поддаются лечению и связаны с высокой заболеваемостью и смертностью. Учитывая заметную нехватку новых классов антибиотиков, которые в насто-

ящее время только разрабатываются, изучение альтернативных противомикробных стратегий в отношении инфекций при МВ имеет решающее значение. Одной из потенциальных альтернатив, вызывающих повышенный интерес клиницистов, является использование бактериофаговой терапии [14].

Бактериальные инфекции, ассоциированные с муковисцидозом

Инфекции при МВ ассоциированы с определенным набором бактериальных, грибных и вирусных патогенов, среди которых наиболее часто идентифицируются *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. и *B. cepacia* complex (рис. 2).

В последние годы, на основании изучения клинических материалов с применением метагеномного анализа, произошло изменение парадигмы в оценке инфекций при МВ – от роли одиночных патогенов к полимикробным ассоциациям. Интересно, что у здоровых людей микробиом респираторного тракта значительно разнообразнее, чем у пациентов с МВ [15]. Оценка микробного разнообразия в клинических материалах больных МВ показала наличие не только бактерий *Streptococcus*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Enterobacteria* и *Pseudomonas*, но и бактериофагов с литической активностью по отношению к данным бактериям, а также грибов [16]. Мало известно о том, как работают антибиотики при лечении инфекций при МВ, каково их воздействие на сложные микробиомы мокроты при МВ и как улучшить эти методы лечения. Так, было показано, что микробиота мокроты в ходе терапии ингаляционным тобрамицином изменилась наиболее заметно через 1 нед. и вышла на плато. Этот сдвиг был в значительной степени обусловлен изменениями в клинически нецелевых бактериях, что подчеркивает важность мониторинга неканонических эффектов антибиотиков и других методов лечения для точного определения и улучшения их клинического воздействия [17]. Были описаны парадоксальные результаты антибиотикотерапии, приводящей не к снижению, а к увеличению бактериальной нагрузки в микробиоме мокроты людей с МВ (на 20% в 17,8% образцов

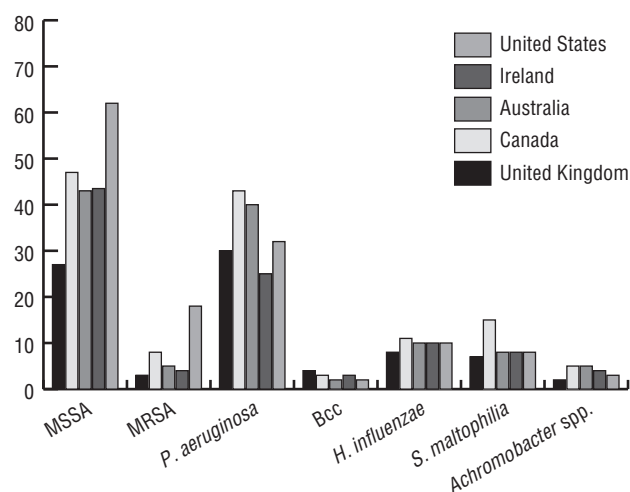


Рис. 2. Возбудители бактериальных инфекций при МВ в Великобритании, Канаде, Австралии и США в 2020 г. [11].
Fig. 2. Causal agents of bacterial infections in CF in the UK, Canada, Australia and the USA in 2020 [11].

и на 40% – в 6,8% образцов), которые согласуются с теоретическими и математическими прогнозами на основе моделирования *in silico* в микроскоме бронхоиол, закупоренных слизью [18]. Эти исследования указывают на необходимость учитывать наличие сложной микробной экологии для борьбы с полимикробной инфекцией при МВ.

Аэробы и факультативные анаэробы *Staphylococcus aureus*

Золотистый стафилококк (*S. aureus*), часто выделяемый из дыхательных путей людей с МВ, является наиболее распространенным микроорганизмом у детей в возрасте 11–17 лет, с инфицированием до 80% пациентов этой возрастной группы. *S. aureus* обычно является кожным комменсалом человека, выделяется из ноздрей и складок кожи. Основным фактором вирулентности этого патогена является лейкоцитолизический токсин лейкоцидин Пантона–Валентайна, ассоциированный с некротизирующей пневмонией. Кроме того, к важным факторам вирулентности относят способность формировать мелкие колонии, биопленкообразование и устойчивость к антистафилококковым антибиотикам [19]. Распространенность инфекций, вызванных метициллин-резистентными *S. aureus* (MRSA), имеющими видоизмененный пенициллинсвязывающий белок, кодируемый геном *mecA*, значительно увеличилась в последние годы в ряде стран, что связано с увеличением числа госпитализаций, частоты использования перорального, ингаляционного и внутривенного применения антибиотиков и более высокой скоростью снижения функции легких [20]. Метициллин-чувствительные *S. aureus* (MSSA) также могут участвовать в патогенезе МВ при ко-инфекции с другими патогенами, такими как *P. aeruginosa* [21].

Pseudomonas aeruginosa

Синегнойная палочка (*P. aeruginosa*) – основной патоген при МВ, и его представленность в респираторном тракте больных МВ возрастает с возрастом. Хроническая псевдомонадная инфекция при МВ ассоциирована с более быстрым снижением функций легких, интенсивной антибиотикотерапией, частотой обострений и смертностью пациентов [22]. *P. aeruginosa* характеризуется наличием множества факторов вирулентности, включая: жгутики, обеспечивающие подвижность патогена; пили адгезии, способствующие прикреплению клеток синегнойной палочки к поверхности эукариотической клетки хозяина; экзополисахариды и альгинат, Pel и Psl, важные для биопленкообразования. *P. aeruginosa* является факультативным анаэробом, обладает природной резистентностью к некоторым β-лактамам, а также способен к быстрому формированию антибиотикорезистентности за счет мутаций и горизонтального переноса генов [23]. Антибиотикотерапия иногда оказывается неудачной из-за того, что инфекция переходит в хроническую форму благодаря селективному отбору в популяции патогена и формированию у него мукоидного статуса [24].

Haemophilus influenzae

Гемофильные палочки (*H. influenzae*) – грамотрицательные коккобациллы, обычно встречающиеся в верхних дыхательных путях как у здоровых, так и у больных людей, но

присутствующие в нижних дыхательных путях только у пациентов с МВ [25]. Возбудитель гемофильной инфекции *H. influenzae* – второй (после MSSA) патоген по частоте инфекций при МВ у детей до 5 лет и раннего подросткового возраста. Основываясь на наличии или отсутствии полисахаридов капсулы, *H. influenzae* классифицируется на шесть капсульных типов (Hia-Hif) и неинкапсулированный тип (NTHi) [26]. Капсульный тип Hib является наиболее вирулентным, он ассоциирован с инвазивными инфекциями; применение конъюгированной Hib-вакцины в некоторых странах и регионах мира привело к изменению эпидемиологических показателей, что значительно снизило долю тяжелых инфекций, вызванных серотипом Hib [27]. *H. influenzae*, выделенные от больных МВ, обладают значительным количеством факторов вирулентности: капсулами серотипов Hia-Hif, которые регулируются и детерминируются генами *bexABCD/hcsAB* и *acs/bcs/ccs/dcs/ecs/fcs* соответственно; пилиями адгезии, определяемыми оперонами *hifABCDE*, *pilABCD* и *comABCDEF*; адгезивными гликопротеинами HMW1/HMW2, кодируемыми оперонами *hmw1ABC* и *hmw2ABC* соответственно, представленными в 80% клинических изолятов NTHi; белками Hia и Hsf, кодируемыми генами *hia* и *hsf* соответственно (белок Hia обнаружен в клетках NTHi, в которых не экспрессируются HMW1/HMW2, а белок Hsf – в капсулообразующих штаммах); Ig-протеазой (*igaAB*); мономерным самосвязывающимся ауто-транспортером Nap, гомологичным протеазе IgA1; белком внешней мембраны Omp5 и фактором выживания в макрофагах (*msf*) [28]. *H. influenzae*, выделенные от пациентов с МВ, характеризуются способностью приобретать резистентность к нескольким классам антибиотиков, что связано с их гипермутабельным адаптационным фенотипом. Учитывая высокий уровень распространения штаммов *H. influenzae* в дыхательных путях больных МВ, представляется необходимым проводить исследования, направленные на как можно более раннюю идентификацию патогена, его фенотипов и генотипов с целью выбора адекватной терапии [29].

Streptococcus pneumoniae

S. pneumoniae – распространенный представитель комменсальной флоры носоглотки, особенно у детей. Частота носительства составляет от 5 до 20% у здоровых детей в Европе и Соединенных Штатах, но гораздо выше (>80%) в развивающихся странах. Носительство может привести к различным заболеваниям, таким как средний отит, пневмония, септицемия и менингит, особенно у маленьких детей, пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. Пневмококковые инфекции являются причиной большего числа смертей, чем другие инфекционные заболевания во всем мире [30]. Патогенный потенциал *S. pneumoniae* чрезвычайно высок благодаря наличию у него многочисленных факторов вирулентности: полисахаридная капсула, имеющая >90 типов, пневмолизин, холинсвязывающие белки (CBPs), которые включают аутолизин LytA, переменные CBPs PspA, PspC и PSPPA, а также гиалуронидазу HlyA.

S. pneumoniae был идентифицирован методом полимеразной цепной реакции у 19% (24/129) взрослых пациентов с МВ, не получавших пневмококковую вакцинацию, во время проспективного обсервационного исследования в Центре борьбы с муковисцидозом, Милан, Италия, в период с марта

2017 г. по сентябрь 2019 г. [31]. Носительство *S. pneumoniae* среди детей школьного возраста и подростков с МВ также оказалось достаточно высоким (19,8%), и вакцинация пневмококковыми конъюгатами, проводимая на первом году жизни, не снижала риск повторной колонизации в более позднем детском и подростковом возрасте. Такой показатель указывает на возможность возникновения *S. pneumoniae*-инфекции у таких пациентов. В качестве иллюстрации может быть представлен клинический случай заглочного абсцесса и сепсиса у пациентки 45 лет с МВ после трансплантации легких. Было установлено, что источником инфекции было удаление зубов мудрости за 6 мес. до описанного случая [32].

В целом роль *S. pneumoniae* в развитии МВ изучена недостаточно. Популяция пневмококков изменилась после введения семивалентной конъюгированной вакцины PCV7 и 13-валентной конъюгированной вакцины PCV13. В исследовании, проведенном в крупном итальянском центре по борьбе с МВ в период с января 2010 г. по май 2012 г., от 32 детей с МВ было выделено 44 штамма *S. pneumoniae*, 16% которых были резистентны к пенициллину, а >56% – к эритромицину, клиндамицину и тетрациклину. Наиболее частым выявленным серотипом был серотип 3 (32%), >80% штаммов относились к референтным клонам сети молекулярной эпидемиологии пневмококков (PMEN), наиболее распространенными из которых были Нидерланды (3)-ST180 (28%) и Греция (21)-30/ST193 (15%). Все штаммы продуцировали биопленку *in vitro*, но с разной эффективностью. Высокая частота выделения устойчивых к антибиотикам пневмококков серотипа 3 у пациентов с МВ позволила предположить, что PCV13 может повысить защиту от пневмококковой колонизации и инфекции [33].

Burkholderia cepacia complex

B. cepacia complex (Всс) включает в себя >22 близкородственных видов, которые выделяют из дыхательной системы пациентов с МВ: *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. multivorans*, *B. vietnamensis* и др. Наиболее распространенными (85–97%) возбудителями легочных инфекций, вызванных Всс, являются *B. cenocepacia* и *B. multivorans*, которые в 94 и 50% случаев соответственно вызывают хроническую инфекцию, несмотря на интенсивную антибиотикотерапию [34]. Микроорганизмы Всс относят к высоковирулентным, имеющим следующие факторы вирулентности: пили адгезии, внеклеточные протеазы, чувство кворума, биопленкообразование и система секреции III типа, обеспечивающая инвазию в эукариотические клетки [35]. Показано, что уровень смертности от инфекций, вызванных *B. cenocepacia*, в 5 раз выше, чем от инфекций, вызванных другими видами Всс [36]. Отмечается, что все виды Всс имеют высокий уровень природной и легко приобретаемой антибиотикостойчивости, что существенно сокращает возможности эффективной антибиотикотерапии, которая еще более затруднительна, чем таковая при лечении инфекций, вызванных *P. aeruginosa* [37].

Stenotrophomonas maltophilia

S. maltophilia – грамотрицательные облигатно-аэробные неферментирующие бактерии, широко распространенные в природных источниках, характеризующиеся множественной

антибиотикорезистентностью, клиническая значимость которых при МВ растет в течение нескольких последних десятилетий, достигая уровня 8–14% у взрослых пациентов с МВ [38]. Хроническая *S. maltophilia*-инфекция рассматривается в качестве фактора риска для госпитализации при других равных параметрах инфекции, таких как стадия заболевания, возраст пациента и наличие ко-инфекции *P. aeruginosa*, а также повышает вероятность риска смерти (в 3 раза) или трансплантации легких. К числу факторов вирулентности *S. maltophilia* относят: внеклеточные ферменты (такие как щелочные сериновые протеазы), липополисахариды внешней мембраны и способность к формированию биопленок. Антибиотикорезистентность обеспечивается наличием универсальных эффлюксных насосов, β-лактамаз, аминогликозид-модифицирующих ферментов и снижением проницаемости внешней мембраны [39].

Achromobacter spp.

Бактерии рода *Achromobacter* – грамотрицательные, каталазоположительные, оксидазоположительные, неспорообразующие, неферментирующие, подвижные аэробные палочки, обычно обнаруживаемые в почве и воде. Способность к прикреплению и инвазии в клетки респираторного тракта обеспечиваются наличием жгутиков, которые являются факторами связывания с муцином, коллагеном и фибронектином [40]. Для этих бактерий, как и для *P. aeruginosa*, характерна способность формировать биопленки, а также наличие природной резистентности к нескольким классам антимикробных препаратов за счет экспрессии эффлюксных насосов, β-лактамаз и аминогликозид-модифицирующих ферментов. *A. xylosoxidans* – наиболее представленный вид, вызывающий 42% *Achromobacter* spp.-инфекций при МВ. Факторами риска хронической *A. xylosoxidans*-инфекции являются старческий возраст пациента и хроническая *P. aeruginosa*-инфекция. При этом отмечается двукратное увеличение вероятности риска смерти или трансплантации легких [41]. В настоящее время отсутствует стандартный протокол эрадикации *A. xylosoxidans* при хронической инфекции. В клинической практике используется ингаляционная терапия цефтазидимом, колистином или тобрамицином, а в последнее время – терапия цефидероколом, парентеральным препаратом нового поколения, созданным на основе конъюгированных молекул сидерофора и цефалоспорина [42].

Нетуберкулезные микобактерии

Нетуберкулезные микобактерии (НТМ) являются значимыми патогенами (до 20%) при инфекциях у пациентов с МВ. Эта группа включает в себя медленно растущие микобактерии, такие как *Mycobacterium avium* complex (MAC), и быстро растущие микобактерии, такие как *M. abscessus* complex (MABC). Диагностика НТМ у людей с МВ является сложной задачей, поскольку у большинства из них инфекция НТМ является транзитной или вялотекущей, без признаков клинических проявлений. Лечение требует длительной многокомпонентной терапии, которая варьируется в зависимости от вида НТМ, характера резистентности к антимикробным препаратам и степени заболевания [43].

MAC включает в себя *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera* и др. Виды MAC ассоциированы с большинством инфек-

ций, вызванных микобактериями, у лиц с МВ в США. В 2016–2020 гг. было показано, что патоген характеризовался поликлональностью (18 генетических кластеров), что указывает на множественность путей заражения людей с МВ инфекциями MAC [44]. Несмотря на то, что *M. chimaera* является менее вирулентным видом по сравнению с *M. avium* и *M. intracellulare*, было зарегистрировано несколько случаев легочных инфекций, вызванных этим патогеном, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, МВ, бронхоэктазами, злокачественными новообразованиями или иммуносупрессией [45]. Терапия MAC-инфекции включает в себя пероральный прием антибиотиков в течение 12–18 мес., дополненный внутривенным или аэрозольным амикацином в случае неэффективного первоначального лечения.

МABC – это группа новых, высокоустойчивых к антимикробным препаратам нетуберкулезных микобактерий. Это оппортунистический патоген, поражающий пациентов с хроническими заболеваниями легких, в первую очередь с МВ, или с иммуносупрессией. *M. abscessus* представляет растущую угрозу для уязвимых групп населения, особенно молодых пациентов с МВ – пациенты в возрасте до 24 лет признаны группой наибольшего риска заражения. На основании генотипирования идентифицированы подвиды *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* и *M. abscessus* subsp. *bolletii*. В 2016 г. описан доминирующий циркулирующий клон *M. abscessus* DCC1 у пациентов с МВ, который распространился по всему миру и несет ген устойчивости к макролидам erm [46]. Результаты тестирования на чувствительность *M. abscessus* к антимикробным препаратам показали, что 65,5% всех изолятов устойчивы как минимум к трем использованным антибиотикам. Исследователями Чешской Республики и Словакии опубликованы доказательства в исследовании потенциальной передачи *M. abscessus* между пациентами, как через прямой, так и через косвенный контакт [47]. В другом крупном исследовании в Германии, напротив, не было зарегистрировано внутрибольничной передачи *M. abscessus* от человека к человеку [48]. Лечение МABC-инфекции более сложное, чем лечение MAC, и требует длительной многокомпонентной внутривенной терапии в первые недели или месяцы с последующей длительной пероральной лекарственной терапией и часто распыляемыми аминогликозидами.

Таким образом, легочные инфекции НТМ стали значительной проблемой среди людей, живущих с МВ. По сравнению с другими сложными инфекционными синдромами, для лечения инфекций, вызванных НТМ у людей с МВ, отсутствует доказательная база по фармакокинетике и фармакодинамике антимикробных препаратов, что вынуждает лечащих врачей ориентироваться на руководства, разработанные для других форм заболеваний [49].

Анаэробы

Анаэробы – группа грамположительных и грамотрицательных организмов, которым для выживания требуется пониженное содержание кислорода. Они обычно колонизируют различные слизистые поверхности человеческого тела, включая верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и женские половые пути. Они ассоциированы с инвазивными

гнойными инфекциями мозга, придаточных пазух носа, легких, печени и кровеносных сосудов. К факторам патогенности анаэробных микроорганизмов относят капсульный полисахарид, гемолизины, протеазы и липополисахариды. Потенциальная значимость анаэробов при МВ подтверждается тем, что относительное обилие анаэробных таксонов в образцах дыхательных путей людей с кистозным фиброзом доминировало во время легочных обострений [50, 51].

Повышенное содержание вязких секретов приводит к развитию тканевой гипоксии в респираторном тракте больных МВ. В биотопах пациентов создаются анаэробные условия, тканевая гипоксия создает условия для колонизации анаэробов на эпителии [52].

К наиболее распространенным представителям анаэробных бактерий, обнаруживаемых в дыхательных путях при МВ, относятся *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium* и *Actinomyces* [53]. Однако роль анаэробов в заболевании легких при МВ остается спорной, поскольку у здоровых добровольцев в респираторном тракте выявляются анаэробы тех же родов, что и у больных МВ, хотя и в значительно меньших количествах. Анаэробы могут взаимодействовать с другими организмами, присутствующими в дыхательных путях при МВ, например, *Prevotella intermedia* играла опосредованную патогенную роль защищая своими β-лактамазами расширенного спектра *P. aeruginosa* от цефтазидима, что продемонстрировано *in vitro*. Факт усиления вирулентности *P. aeruginosa* описан также для анаэробного грамотрицательного микроорганизма *Veillonella parvula*, что продемонстрировано в экспериментах на животных при коинфекции этих двух микроорганизмов [54]. В другом исследовании, напротив, авторы делают вывод о положительной роли анаэробов для пациентов с МВ – их разнообразие обуславливает неострое мягкое протекание заболевания (*milder disease*), а снижение разнообразия анаэробов может играть роль в прогрессировании легочного заболевания МВ [55]. Дальнейшее исследование роли анаэробов в патогенезе кистозного фиброза позволит оценить целесообразность разработки антимикробных таргетных препаратов для лечения больных МВ.

Грибковые инфекции

Наиболее распространенными (78%) нитчатыми грибами, выделяемыми из дыхательных путей при МВ, являются виды рода *Aspergillus*. Часто это связано с бессимптомной колонизацией, но также может представлять собой аллергический бронхолегочный аспергиллез, который характеризуется симптомами, похожими на астму, положительным кожным тестом на *Aspergillus*, повышенным уровнем IgE в сыворотке и снижением функции легких [56]. Иногда *Aspergillus* могут вызывать бронхит, связанный с усилением воспаления легких. Хроническая инфекция *Aspergillus fumigatus* является независимым фактором риска обострения заболевания легких, часто отмечается ко-инфекция с *P. aeruginosa*.

Грибы рода *Scedosporium*, сапрофитные нитчатые грибы, гораздо реже встречаются у пациентов с МВ, но также могут вызывать серьезные инвазивные инфекции при иммунодефицитных состояниях, поражая легкие, кости, глаза, кровеносные сосуды и центральную нервную систему [57]. Из респираторных образцов больных МВ также могут быть выде-

лены *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, которые ассоциированы с ухудшением состояния пациентов с МВ.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* являются наиболее часто выделяемыми дрожжами из дыхательных путей больных МВ. Их распространенность достигает 80%, что неудивительно, учитывая, что они являются нормальными колонистами ротоглотки. Хроническая инфекция *Candida* spp. связана с худшими клиническими результатами пациентов с МВ [58].

Вирусные инфекции

Распространенность вирусных инфекций во время легочных обострений у лиц с МВ оценивается в пределах 13–60%, однако этот уровень может быть недооценен из-за недостаточной обследованности пациентов. Наиболее часто идентифицируемыми вирусами у пациентов с МВ являются респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), человеческий риновирус, вирус гриппа типов А и В и вирус парагриппа, хотя были также описаны многие другие вирусы, включая человеческий метапневмовирус, пикорнавирус, коронавирусы, Коксаки и эховирус. Вирусные инфекции чаще выявляются у детей, кроме того, дети с МВ с чаще испытывают обострения, связанные с вирусными инфекциями, по сравнению с детьми без МВ. Повышенная тяжесть вирусных инфекций у лиц с МВ по сравнению с лицами, не страдающими МВ, связана с пониженным врожденным противовирусным ответом у первой популяции [59].

Особое значение при МВ имеет РСВ, так как он часто выделяется как от детей, так и от взрослых больных МВ и может вызывать тяжелые симптомы, включая риносинусит, кашель, лихорадку и острый средний отит, бронхолит, пневмонию и обострение хронического заболевания дыхательных путей. У детей с МВ чаще отмечаются госпитализации, связанные с РСВ, по сравнению со здоровыми детьми. Аналогично, инфекция вируса гриппа также связана со значительной заболеваемостью у детей с МВ. Потенциальный механизм обострений заболевания у лиц с МВ может быть обусловлен взаимодействием вирусов с бактериями в дыхательных путях, с последующим изменением состава микробного сообщества. Так, описаны случаи ассоциации РСВ-инфекции с повышенным образованием биопленки *P. aeruginosa* за счет нарушения регуляции гомеостаза железа в эпителии дыхательных путей при МВ. Другой пример – наиболее частая вирусно-бактериальная ко-инфекция у детей, вызванная риновирусом и *S. aureus* [60].

Заключение

Инфекции респираторного тракта у больных МВ – значительный фактор заболеваемости и смертности, даже в настоящее время, при наличии современной терапии основного заболевания, базирующейся на коррекции и/или усилении функции канала CFTR. Ведущими патогенами, вызывающими инфекционные обострения у пациентов с МВ, общепризнаны *P. aeruginosa* и представители комплекса *Burkholderia cepacia*, однако и представители других таксонов микроорганизмов могут оказывать клиническое воздействие на функцию легких и показатели смертности у лиц с МВ. Важную роль в раскрытии роли микробных сообществ и их взаимодействия в дыхательных путях при МВ играют дости-

жения в области молекулярных технологий. Научное и медицинское сообщество возлагает большие надежды на инновационные технологии в плане разработки новых стратегий борьбы с МВ и сопутствующими инфекциями.

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 / References

1. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. Lancet. 2021;397(10290):2195-2211. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32542-3
2. Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2022;21(3):456-462. DOI: 10.1016/j.jcf.2022.01.009
3. Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet. 2016;19(11)388(10059):2519-2531. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6
4. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. CFTR protein: not just a chloride channel? Cells 2021;22(10):2844. DOI: 10.3390/cells10112844
5. Schäfer J, Griese M, Chandrasekaran R, Chotirmall SH, Hartl D. Pathogenesis, imaging and clinical characteristics of CF and non-CF bronchiectasis. BMC Pulm Med. 2018 May 22;18(1):79. DOI: 10.1186/s12890-018-0630-8
6. Boucher R. Muco-Obstructive Lung Diseases. N Engl J Med 2019;380(20):1941-1953. DOI: 10.1056/NEJMra1813799
7. Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M, Lampronti I, Alessia Finotti A, Pinton P, et al. Role of cystic fibrosis bronchial epithelium in neutrophil chemotaxis. Front Immunol. 2020;8(4)11:1438. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01438
8. Ng H, Zhou Y, Song K, Hodges C, Drumm M, Wang G. Neutrophil-mediated phagocytic host defense defect in myeloid CFTR-inactivated mice. PLoS One. 2014;9(9):e106813. DOI: 10.1371/journal.pone.0106813
9. Alqasmi M. Therapeutic Interventions for *Pseudomonas Infections* in Cystic Fibrosis Patients: A Review of Phase IV Trials. J Clin Med. 2024 Oct 30;13(21):6530. DOI: 10.3390/jcm13216530
10. Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al.; International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. J Heart Lung Transplant. 2016 Oct;35(10):1170-1184. DOI: 10.1016/j.healun.2016.09.001
11. Blanchard AC, Waters VJ. Opportunistic pathogens in cystic fibrosis: epidemiology and pathogenesis of lung infection. J Pediatric Infect Dis Soc. 2022;11(Suppl_2):S3-S12.
12. Bonyadi P, Saleh NT, Dehghani M, Yamini M, Amini K. Prevalence of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis infection: A systematic review and meta-analysis. Microb Pathog. 2022 Apr;165:105461. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105461
13. Fainardi V, Neglia C, Muscarà M, Spaggiari C, Tornesello M, Grandinetti R, et al. Multidrug-Resistant Bacteria in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. Children (Basel). 2022 Sep 1;9(9):1330. DOI: 10.3390/children9091330
14. Canning JS, Laucirica DR, Ling KM, Nicol MP, Stick SM, Kicic A. Phage therapy to treat cystic fibrosis *Burkholderia cepacia* complex lung infections: perspectives

- and challenges. *Front Microbiol.* 2024 Oct 18;15:1476041. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1476041
15. Feigelman R, Kahlert CR, Baty F, Rassouli F, Kleiner RL, Kohler P, et al. Sputum DNA sequencing in cystic fibrosis: non-invasive access to the lung microbiome and to pathogen details. *Microbiome.* 2017 Feb 10;5(1):20. DOI: 10.1186/s40168-017-0234-1
 16. de Almeida OGG, Capizzani CPDC, Tonani L, Grizante Barião PH, da Cunha AF, De Martinis ECP, et al. The Lung Microbiome of Three Young Brazilian Patients With Cystic Fibrosis Colonized by Fungi. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 11;10:598938. DOI: 10.3389/fcimb.2020.598938
 17. Nelson MT, Wolter DJ, Eng A, Weiss EJ, Vo AT, Brittnacher MJ, et al. Maintenance tobramycin primarily affects untargeted bacteria in the CF sputum microbiome. *Thorax.* 2020 Sep;75(9):780-790. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2019-214187
 18. Ghuneim LJ, Raghuvanshi R, Neugebauer KA, Guziar DV, Christian MH, Schena B, et al. Complex and unexpected outcomes of antibiotic therapy against a polymicrobial infection. *ISME J.* 2022 Sep;16(9):2065-2075. DOI: 10.1038/s41396-022-01252-5
 19. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Apr;29(2):401-27. DOI: 10.1128/CMR.00069-15
 20. Zobell JT, Epps KL, Young DC, Montague M, Olson J, Ampofo K, et al. Utilization of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015 Jun;50(6):552-9. DOI: 10.1002/ppul.23132
 21. Esposito S, Blasi F, Curtis N, Kaplan S, Lazzarotto T, Meschiari M, et al. New Antibiotics for *Staphylococcus aureus* Infection: An Update from the World Association of Infectious Diseases and Immunological Disorders (WAidid) and the Italian Society of Anti-Infective Therapy (SITA). *Antibiotics (Basel).* 2023 Apr 12;12(4):742. DOI: 10.3390/antibiotics12040742
 22. Hewer SCL, Smyth AR, Brown M, Jones AP, Hickey H, Kenna D, et al.; TORPEDO-CF study group. Intravenous versus oral antibiotics for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis (TORPEDO-CF): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2020 Oct;8(10):975-986. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30331-3
 23. Kidd TJ, Canton R, Ekkelenkamp M, Johansen HK, Gilligan P, LiPuma JJ, et al.; Antimicrobial Resistance in Cystic Fibrosis International Working Group. Defining antimicrobial resistance in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2018 Nov;17(6):696-704. DOI: 10.1016/j.jcf.2018.08.014
 24. Beaudoin T, Lafayette S, Nguyen D, Rousseau S. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* caused by *mucA* mutations result in activation of TLR2 in addition to TLR5 in airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Nov 9;428(1):150-4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.030
 25. Saliu F, Rizzo G, Bragonzi A, Cariani L, Cirillo DM, Colombo C, et al. Chronic infection by nontypeable *Haemophilus influenzae* fuels airway inflammation. *ERJ Open Res.* 2021 Mar 22;7(1):00614-2020. DOI: 10.1183/23120541.00614-2020
 26. Xiao J, Su L, Huang S, Liu L, Ali K, Chen Z. Epidemic Trends and Biofilm Formation Mechanisms of *Haemophilus influenzae*: Insights into Clinical Implications and Prevention Strategies. *Infect Drug Resist.* 2023 Aug 16;16:5359-5373. DOI: 10.2147/IDR.S424468
 27. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. *Lancet Glob Health.* 2018 Jul;6(7):e744-e757. DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30247-X
 28. Krisna MA, Alimsardjono L, Salsabila K, Vermasari N, Daningrat WOD, Kuntaman K, et al. Whole-genome sequencing of non-typeable *Haemophilus influenzae* isolated from a tertiary care hospital in Surabaya, Indonesia. *BMC Infect Dis.* 2024 Oct 3;24(1):1097. DOI: 10.1186/s12879-024-09826-8
 29. Ebbing R, Robertson CF, Robinson PJ. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in cystic fibrosis: 15 years experience. *J Med Microbiol Diagn.* 2015;S5(004).
 30. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Jul 1;3(7):a010215. DOI: 10.1101/cshperspect.a010215
 31. Gramegna A, Aliberti S, Terranova L, Oriano M, Contarini M, Blasi F. Prevalence and serotyping of *S. pneumoniae* in a large vaccine-naïve cohort of adults with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Nov;40(11):2443-2446. DOI: 10.1007/s10096-021-04263-w
 32. Ladores S, Bray LA, Brown J, Corcoran J, Jordan J, Buczek E. Retropharyngeal abscess in a post-lung transplant cystic fibrosis patient with prior cervical fusion: a case study. *BMC Pulm Med.* 2020 Aug 24;20(1):224. DOI: 10.1186/s12890-020-01269-6
 33. Pimentel de Araujo F, D'Ambrosio F, Camilli R, Fiscarelli E, Di Bonaventura G, Baldassarri L, et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* clones from paediatric patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 2014 Dec;63(Pt 12):1704-1715. DOI: 10.1099/jmm.0.072199-0
 34. Akkerman-Nijland AM, Rottier BL, Holstein J, Winter RLJ, Touw DJ, Akkerman OW, et al. Eradication of *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis patients with inhalation of amiloride and tobramycin combined with oral cotrimoxazole. *ERJ Open Res.* 2023 Jun 26;9(3):00055-2023. DOI: 10.1183/23120541.00055-2023
 35. Ganesh PS, Vishnupriya S, Vadivelu J, Mariappan V, Vellasamy KM, Shankar EM. Intracellular survival and innate immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. *Microbiol Immunol.* 2020 Feb;64(2):87-98. DOI: 10.1111/1348-0421.12762
 36. Nye C, Duckers J, Dhillon R. Cefiderocol to manage chronic, multi-drug-resistant *Burkholderia cepacia* complex infection in a patient with cystic fibrosis: a case report. *Access Microbiol.* 2022 Oct 7;4(10):acmi000413. DOI: 10.1099/acmi.0.000413
 37. Gutiérrez Santana JC, Coria Jiménez VR. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: critical gaps in diagnosis and therapy. *Ann Med.* 2024 Dec;56(1):2307503. DOI: 10.1080/07853890.2024.2307503
 38. Amin R, Jahnke N, Waters V. Antibiotic treatment for *Stenotrophomonas maltophilia* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Mar 18;3(3):CD009249. DOI: 10.1002/14651858.CD009249.pub5
 39. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, et al. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 2008 Apr 17;9(4):R74. DOI: 10.1186/gb-2008-9-4-r74
 40. Filipic B, Malesevic M, Vasiljevic Z, Lukic J, Novovic K, Kojic M, et al. Uncovering Differences in Virulence Markers Associated with *Achromobacter* Species of CF and Non-CF Origin. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 May 29;7:224. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00224
 41. Somayaji R, Stanojevic S, Tullis DE, Stephenson AL, Ratjen F, Waters V. Clinical Outcomes Associated with *Achromobacter* Species Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2017 Sep;14(9):1412-1418. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201701-0710C
 42. Zhanel GG, Golden AR, Zelenitsky S, Wiebe K, Lawrence CK, Adam HJ, et al. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs.* 2019 Feb;79(3):271-289. DOI: 10.1007/s40265-019-1055-2
 43. Martiniano SL, Nick JA, Daley CL. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med.* 2022 Dec;43(4):697-716. DOI: 10.1016/j.ccm.2022.06.010
 44. Hasan NA, Davidson RM, Epperson LE, Kammlade SM, Beagle S, Levin AR, et al. Population Genomics and Inference of *Mycobacterium avium* Complex Clusters in Cystic Fibrosis Care Centers, United States. *Emerg Infect Dis.* 2021 Nov;27(11):2836-2846. DOI: 10.3201/eid2711.210124
 45. Seminara MM, Visca D, Repossi AC, Spanevello A. *Mycobacterium chimaera*: a case report from Italy. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2024 Sep 13. DOI: 10.4081/monaldi.2024.2933

46. Yoshida M, Chien JY, Morimoto K, Kinjo T, Aono A, Murase Y, et al. Molecular Epidemiological Characteristics of *Mycobacterium abscessus* Complex Derived from Non-Cystic Fibrosis Patients in Japan and Taiwan. *Microbiol Spectr.* 2022 Jun 29;10(3):e0057122. DOI: 10.1128/spectrum.00571-22
47. Dohál M, Dvořáková V, Hromádková M, Pinková M, Amlerová J, Schwarz M, et al. High rate of macrolide resistance and closely genetically related *Mycobacterium abscessus* complex strains identified among both cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients within two countries. *Microbiol Spectr.* 2024 Oct 23;12(12):e0105624. DOI: 10.1128/spectrum.01056-24
48. Wetzstein N, Diricks M, Kohl TA, Wichelhaus TA, Andres S, Paulowski L, et al. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium abscessus* Isolates Recovered from German Cystic Fibrosis Patients. *Microbiol Spectr.* 2022 Aug 31;10(4):e0171422. DOI: 10.1128/spectrum.01714-22
49. Burke A, Smith D, Coulter C, Bell SC, Thomson R, Roberts JA. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in the Drug Treatment of Non-Tuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. *Clin Pharmacokinet.* 2021 Sep;60(9):1081-1102. DOI: 10.1007/s40262-021-01010-4
50. Carmody LA, Caverly LJ, Foster BK, Rogers MAM, Kalikin LM, Simon RH, et al. Fluctuations in airway bacterial communities associated with clinical states and disease stages in cystic fibrosis. *PLoS One.* 2018 Mar 9;13(3):e0194060. DOI: 10.1371/journal.pone.0194060
51. Layeghifard M, Li H, Wang PW, Donaldson SL, Coburn B, Clark ST, et al. Microbiome networks and change-point analysis reveal key community changes associated with cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2019 Jan 21;5(1):4. DOI: 10.1038/s41522-018-0077-y
52. Ribeiro CMP, Higgs MG, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Borgatti M, Lampronti I, et al. Revisiting Host-Pathogen Interactions in Cystic Fibrosis Lungs in the Era of CFTR Modulators. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 5;24(5):5010. DOI: 10.3390/ijms24055010
53. Muhlebach MS, Hatch JE, Einarsson GG, McGrath SJ, Gilipin DF, Lavelle G, et al. Anaerobic bacteria cultured from cystic fibrosis airways correlate to milder disease: a multisite study. *Eur Respir J.* 2018 Jul 11;52(1):1800242. DOI: 10.1183/13993003.00242-2018
54. Pustelny C, Komor U, Pawar V, Lorenz A, Bielecka A, Moter A, et al. Contribution of *Veillonella parvula* to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated pathogenicity in a murine tumor model system. *Infect Immun.* 2015 Jan;83(1):417-29. DOI: 10.1128/IAI.02234-14
55. Zemanick ET, Harris JK, Wagner BD, Robertson CE, Sagel SD, Stevens MJ, et al. Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PLoS One.* 2013 Apr 30;8(4):e62917. DOI: 10.1371/journal.pone.0062917
56. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2010 Jan;137(1):171-6. DOI: 10.1378/chest.09-1103
57. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, de Hoog GS, et al. Epidemiology and outcome of *Scenedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med Mycol.* 2009 Jun;47(4):359-70. DOI: 10.1080/13693780802524506
58. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest.* 2010 Nov;138(5):1186-95. DOI: 10.1378/chest.09-2996
59. Flight WG, Bright-Thomas RJ, Tilston P, Mutton KJ, Guiver M, Morris J, et al. Incidence and clinical impact of respiratory viruses in adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 2014 Mar;69(3):247-53. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2013-204000
60. Miró-Cañís S, Capilla-Rubio S, Marzo-Checa L, Fontanals-Aymerich D, Sanfeliu-Sala I, Espasa-Soley M, et al. Multiplex PCR reveals that viruses are more frequent than bacteria in children with cystic fibrosis. *J Clin Virol.* 2017 Jan;86:1-4. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.11.004

Информация о соавторах:

Пославская Евгения Евгеньевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сухаричева Наталья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кагазеев Резуан Уматиевич, аспирант лаборатории муковисцидоза ФГБУ «НИИ пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Красовский Станислав Александрович, старший научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего лабораторией муковисцидоза ФГБУ «НИИ пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России

Information about co-authors:

Eugenia E. Poslavskaya, Junior Researcher, Department of Culture Collections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalia A. Sukharicheva, Junior Researcher, Department of Culture Collections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Rezuan U. Kagazezhev, postgraduate student of the cystic fibrosis laboratory of the Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Pulmonology" of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

Anastasia Yu. Lebedeva, Junior Researcher, Department of Culture Collections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Stanislav A. Krasovsky, Senior Researcher, Acting Head of the Cystic Fibrosis Laboratory of the Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Pulmonology" of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

НОВОСТИ НАУКИ

Технология CRISPR-Cas: баланс эффективности и безопасности

Ингибитор ДНК-ПКс AZD7648 усиливает эффективность гомологически-направленной репарации CRISPR-Cas9 с потенциалом клинической полезности, но его возможные целевые последствия неизвестны. Мы обнаружили, что редактирование генома с помощью AZD7648 вызывает частые делеции в масштабе килобаз и мегабаз, потерю плеч хромосом и транслокации. Эти крупномасштабные хромосомные изменения ускользают от обнаружения с помощью типичных анализов редактирования генома, что побуждает к осторожности при использовании AZD7648 и усиливает необходимость исследования нескольких типов потенциальных результатов редактирования.

Cullot G, Aird EJ, Schlapansky MF, Yeh CD, van de Venn L, Vykhyantseva I, et al. Genome editing with the HDR-enhancing DNA-PCs inhibitor AZD7648 causes large-scale genomic alterations. *Nat Biotechnol.* 2024 Nov 27. DOI: 10.1038/s41587-024-02488-6

Новые подходы к микробиологическому мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов

И.Е.Самойленко¹, Н.В.Рудаков^{1,2}

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, Омск, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Российская Федерация

Выявление и описание значительного количества новых видов и кандидатов в новые виды риккетсий, часть из которых не культивируются при использовании моделей, традиционных в риккетсиологической практике, а также климатические изменения, ведущие к трансформации биоценозов и нозоареала, диктуют необходимость изменения тактики микробиологического мониторинга. Нами предложен новый подход к мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов, использующий комплекс классических риккетсиологических, молекулярно-биологических и экспериментальных методов. Предлагаемый алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов включает четыре этапа: скрининг ДНК риккетсий в клещах и мелких диких млекопитающих; изучение видовой разнообразия риккетсий, циркулирующих в очаге, в т.ч. в материале от больных; изучение биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага; изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге.

Ключевые слова: риккетсии, микробиологический мониторинг

Для цитирования: Самойленко И.Е., Рудаков Н.В. Новые подходы к микробиологическому мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов. Бактериология. 2024; 9(4): 139–142. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-139-142

New approaches to microbiological monitoring of natural foci of tick-borne rickettsiosis

I.E.Samoylenko¹, N.V.Rudakov^{1,2}

¹Omsk Research Institute of natural focal Infections, Omsk, Russian Federation;

²Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

The identification and characterization of a significant number of new species and candidates for new rickettsiae species, some of which cannot be cultivated using the models traditionally used in rickettsiological practice, as well as climatic changes leading to the transformation of biocenoses and nosoareas, require to change the strategy of microbiological monitoring. We have proposed a new approach to monitoring of natural foci of tick-borne rickettsioses using a complex of classical rickettsiological, molecular-biological and experimental methods. The proposed algorithm for microbiological monitoring of natural foci of tick-borne rickettsioses includes four steps: screening of rickettsial DNA in ticks and small wild mammals; study of the diversity of rickettsial species circulating in the foci, including material from patients; study of the biological properties of rickettsiae in the population of a particular foci; study of the mechanisms of rickettsiae population preservation in the foci.

Key words: rickettsiae, microbiological monitoring

For citation: Samoylenko I.E., Rudakov N.V. New approaches to microbiological monitoring of natural foci of tick-borne rickettsiosis. Bacteriology. 2024; 9(4): 139–142. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-139-142

Являясь важнейшим компонентом информационной подсистемы эпидемиологического надзора, микробиологический мониторинг включает в себя сбор информации о циркулирующих в очаге возбудителях, их вирулентных, культуральных, биохимических, иммунологических и генетических характеристиках. Также он позволяет отслеживать

изменения свойств возбудителей, определять характер эпидемического распространения новых и завозных вариантов возбудителей. По мнению В.В.Шкарина, микробиологический мониторинг – это динамическая оценка циркуляции и биологических свойств возбудителя инфекционного заболевания [1].

Для корреспонденции:

Самойленко Ирина Евгеньевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории зоонозных инфекций отдела ПОВЗ ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Адрес: 644080, Омск, пр-т Мира, 7

Телефон: (3812) 65-14-77

Статья поступила 20.11.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Irina E. Samoylenko, PhD, Leading Researcher of the Zoonotic Infections Laboratory of the Department POBZ Omsk Research Institute of Natural Focal Infections

Address: 7 Mira ave., Omsk, 644080, Russian Federation

Phone: (3812) 65-14-77

The article was received 20.11.2024, accepted for publication 25.12.2024

С конца прошлого столетия наблюдается выявление и описание большого количества новых видов и кандидатов в новые виды риккетсий, что связано с развитием методов молекулярно-биологического анализа. Некоторые из «новых» риккетсий не культивируются при использовании моделей, традиционных в риккетсиологической практике. Также с заметными климатическими изменениями связаны наблюдающиеся в последние годы изменения в сложившихся биоценозах, что может приводить к изменению численности и поведенческих характеристик переносчиков, трансформации нозоареала [2]. Это диктует необходимость изменения тактики микробиологического мониторинга.

Мы предлагаем новый подход к мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов, использующий комплекс классических риккетсиологических, молекулярно-биологических и экспериментальных методов (рисунок), защищенный патентом на промышленный образец (№134323 от 01.12.2022).

На первом этапе, в первую очередь это касается не исследованных ранее территорий, мы рекомендуем скрининг ДНК риккетсий в клещах и мелких диких млекопитающих с

применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием тест-системы «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» либо ПЦР с детекцией в электрофоретическом геле с использованием праймеров к гену *gltA*.

При выявлении ДНК риккетсий на втором этапе мониторинга проводится изучение видового разнообразия риккетсий, циркулирующих в очаге. Объектами исследования на данном этапе являются также образцы крови и биоптаты от больных с клиническими проявлениями клещевых риккетсиозов. С этой целью необходимо проводить ПЦР с праймерами, амплифицирующими 5 house-keeping генов: *gltA*, *ompA*, *ompB*, *16S rRNA*, *sca4* с последующим секвенированием по Сэнгеру. В то же время опыт работы нашей лаборатории свидетельствует о том, что при молекулярно-биологическом мониторинге риккетсий на эндемичных территориях выявление *Rickettsia raoultii* часто «маскирует» присутствие этиологического агента сибирского клещевого тифа (СКТ) – *Rickettsia sibirica* [3]. Этот феномен позволяет объяснить высокий уровень заболеваемости СКТ на изучаемых территориях при редкой выявляемости ДНК *R. sibirica* при молекулярно-биологическом скрининге в искодовых

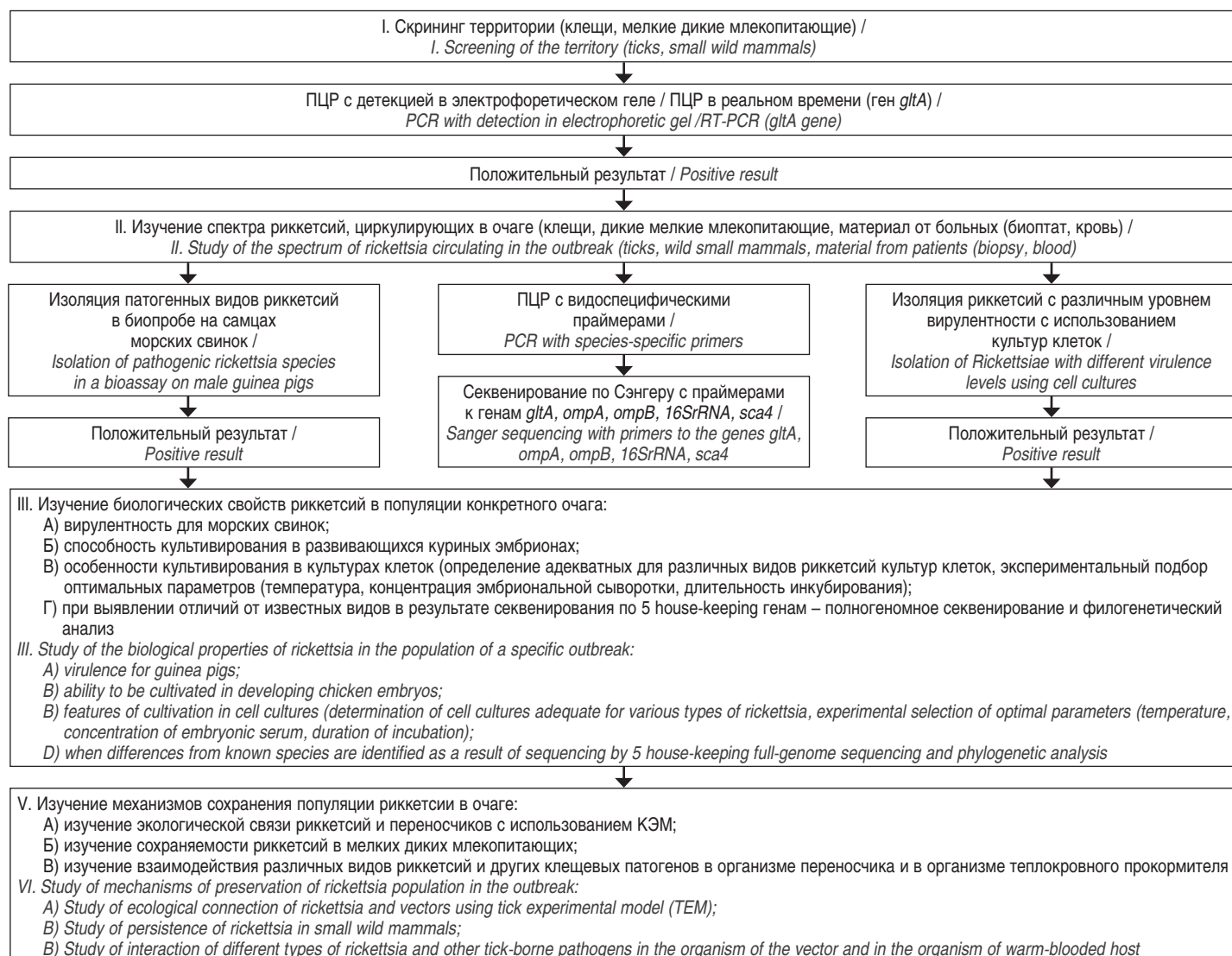


Рисунок. Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов.
 Figure. Algorithm of microbiological monitoring of natural foci of tick-borne rickettsioses.

клещей. Избежать этого позволяет применение метода двухраундовой ПЦР с использованием видоспецифических праймеров генов *gltA* и *ompA* с последующим секвенированием или применение ПЦР-наборов реагентов «РеалБест ДНК *R. sibirica* / *R. heilongjiangensis*» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Всестороннее изучение очага невозможно без изоляции штаммов риккетсий. Для изоляции патогенных видов риккетсий оптимально использовать классический для риккетсиологии метод биопробы на самцах морских свинок. При наличии клинических проявлений (лихорадки, гиперемии, отека мошонки и увеличения яичек, которые перестают вправляться в брюшную полость) проводится вскрытие животных с изъятием органов для дальнейшего пассирования на других биологических моделях. Наибольший интерес представляют паховые лимфатические узлы, яички, селезенка и мозг, наличие риккетсий в которых выявляют молекулярно-биологическими методами и микроскопией. Для изоляции штаммов патогенных риккетсий с низкой вирулентностью или видов (кандидатов в новые виды) с неустановленной патогенностью целесообразно использовать культуры клеток [4, 5]. Идентификацию выделенных штаммов следует проводить по вышеупомянутым house-keeping генам.

Следующим этапом мы предлагаем проводить изучение биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага. Исследование вирулентности изолированных штаммов для морских свинок включает определение максимальной температурной реакции и ее продолжительности, выраженности скротального феномена, минимальной инфицирующей дозы, а также патологоанатомической картины. Мы также считаем обоснованным включение исследования данного биологического свойства в алгоритм мониторинга очагов клещевого риккетсиоза, поскольку с открытием значительного количества новых видов риккетсий в последние годы выяснилось, что не все из них способны культивироваться в куриных эмбрионах. Изучение особенностей культивирования изолированных в очаге штаммов включает определение адекватных для различных видов риккетсий культур клеток, так как известно, что некоторые виды риккетсий, например *Rickettsia peacockii*, требуют определенных видов культур клеток. Кроме того, для каждого нового вида риккетсий необходимо проводить экспериментальный подбор параметров культивирования: оптимальная температура и длительность инкубации, оптимальная концентрация эмбриональной сыворотки [5]. При выявлении в результате секвенирования по 5 house-keeping генам отличий от известных видов целесообразно выполнять полногеномное секвенирование и филогенетический анализ.

Определение фенотипических свойств штаммов риккетсий, циркулирующих в конкретном очаге, помогает правильно оценить характер клинических проявлений и уровень сероконверсии у людей. Необходимо учитывать, что преобладание на периферии нозоареала СКТ штаммов риккетсий, отличающихся низкой иммуногенностью и вирулентностью, проявляется в превалировании заболеваний средней и легкой степени тяжести, а также преобладании у пациентов сероконверсии в невысоких титрах [6]. Эта информация позволяет адекватно проводить диагностику и лечение пациентов с присасыванием клещей в анамнезе.

И, наконец, последним этапом мониторинга мы предлагаем проводить изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге.

Для определения того, является ли конкретный вид иксодид транзиторным или экологически специфическим вектором, мы предлагаем проводить изучение экологической связи риккетсий и переносчиков с использованием клещевой экспериментальной модели (КЭМ), а именно: определение уровня трансвариальной и трансфазовой передачи в голодном состоянии и после кормления на лабораторных животных, как амплифицирующих, так и неамплифицирующих риккетсии [7–10]. Высокая эффективность трансвариальной и трансфазовой передачи при использовании неамплифицирующих теплокровных прокормителей позволяет сделать вывод о возможности сохранения в очаге популяции определенного вида риккетсий только за счет вертикальной передачи.

Роль мелких диких млекопитающих в сохранении популяции риккетсий в очаге напрямую зависит от длительности риккетсемии в их организмах. Оптимально изучать этот процесс с использованием КЭМ, подсаживая на животное зараженных клещей для кормления. При отсутствии такой возможности допустимо парентеральное заражение животных. Нами отработана методика кормления преимагинальных форм клещей рода *Dermacentor* на трех видах полевок.

КЭМ также позволяет изучать взаимодействие различных видов риккетсий и других клещевых патогенов в организме переносчика и в организме теплокровного прокормителя. Изучение межмикробных взаимодействий на разных стадиях развития клещей позволяет выявлять потенциальные синергетические и антагонистические взаимодействия между бактериальными сообществами. Нами в эксперименте показано наличие конкурентных отношений между *R. raoultii* и *R. sibirica* в клещах *Dermacentor marginatus*.

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 no conflict of interests.

Литература

1. Шкарин ВВ, Благодравова АС. Термины и определения в эпидемиологии. Нижний Новгород: Издательство НГМА, 2015.
2. Тарасевич ИВ, Фетисова НФ, Ковтунов АИ. Клещевые риккетсиозы и климат. Изменение климата и здоровье населения России в XXI веке: сб. материалов междунар. семинара. Под ред. Измерова НФ и др. М., 2004;138-143.
3. Штрек СВ, Рудаков НВ, Шпынов СН, Санников АВ, Самойленко ИЕ, Щучинова ЛД, и др. Генотипирование риккетсий, циркулирующих на территориях Республики Алтай и Хабаровского края. Инфекция и иммунитет. 2023;13(1):100-106. DOI: 10.15789/2220-7619-GOR-2014
4. Кумпан ЛВ, Самойленко ИЕ, Шпынов СН, Рудаков НВ. Использование культур клеток для изоляции и культивирования риккетсий новых генотипов. Омский научный вестник. 2006;1(35):135-140.

5. Кумпан ЛВ, Самойленко ИЕ, Решетникова ТА, Шпынов СН, Рудаков НВ. Особенности культивирования нового генотипа *Candidatus Rickettsia tarasevichae* на биологических моделях (культуры клеток, морские свинки). Уральский медицинский журнал. 2011;13(91):67-69.
6. Рудаков НВ, Шпынов СН, Самойленко ИЕ, Оберт АС. Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России. Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2011.
7. Самойленко ИЕ, Шпынов СН, Рудаков НВ. Оптимизация метода экспериментального моделирования естественного цикла метаморфоза переносчиков для изоляции, культивирования и изучения риккетсий новых генотипов. Омский научный вестник. 2006;прил. 1(35):93-95.
8. Samoylenko IE, Rudakov NV, Shpynov SN, Tankibaev MA, Yakimenko VV, Kumpan LV. Study of biological characteristics of spotted fever group rickettsial genotypes RpA4, DnS14, and DnS28. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:612-6. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07435.x
9. Samoylenko IE, Kumpan LV, Shpynov SN, Obert AS, Butakov OV, Rudakov NV. Methods of isolation and cultivation of new *Rickettsiae* from the Nosoarea of the north Asian tick typhus in Siberia. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:613-6. DOI: 10.1196/annals.1374.035
10. Боброва ОА, Самойленко ИЕ, Якименко ВВ, Штрек СВ, Рар ВА, Иголкина ЯП. Изучение уровня трансвариальной передачи *Candidatus R. tarasevichae* в лабораторных линиях клещей *Ixodes persulcatus*. Материалы IV Нац. конгресса бактериологов и Междунар. симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». Омск, 2018;14-15.
4. Kumpan LV, Samoylenko IE, Shpynov SN, Rudakov NV. Using of cell cultures for isolation and cultivation of rickettsiae of new genotypes. Omsk Scientific Bulletin. 2006;1(35):135-140. (In Russian).
5. Kumpan LV, Samoylenko IE, Reshetnikova TA, Shpynov SN, Rudakov NV. Peculiarities of cultivation of a new genotype of *Candidatus Rickettsia tarasevichae* on biological models (cell cultures, guinea pigs). Ural Medical Journal. 2011;13(91):67-69. (In Russian).
6. Rudakov NV, Shpynov SN, Samoylenko IE, Obert AS. Tick-borne rickettsiosis and rickettsia of the tick-borne spotted fever group in Russia. Omsk: IC "Omsk Scientific Bulletin" 2011. (In Russian).
7. Samoylenko IE, Shpynov SN, Rudakov NV. Optimization of the method of experimental modeling of the natural cycle of metamorphosis of carriers for the isolation, cultivation and study of rickettsia of new genotypes. Omsk Scientific Bulletin. 2006; прил. 1(35):93-95. (In Russian).
8. Samoylenko IE, Rudakov NV, Shpynov SN, Tankibaev MA, Yakimenko VV, Kumpan LV. Study of biological characteristics of spotted fever group rickettsial genotypes RpA4, DnS14, and DnS28. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:612-6. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07435.x
9. Samoylenko IE, Kumpan LV, Shpynov SN, Obert AS, Butakov OV, Rudakov NV. Methods of isolation and cultivation of new *Rickettsiae* from the Nosoarea of the north Asian tick typhus in Siberia. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:613-6. DOI: 10.1196/annals.1374.035
10. Bobrova OA, Samoylenko IE, Yakimenko VV, Shtrek SV, Rar VA, Igolkina YaP. Study of the level of transovarial transmission of *Candidatus R. tarasevichae* in laboratory lines of *Ixodes persulcatus* ticks. Proceedings of the 1V National Congress of Bacteriologists and the International Symposium "Microorganisms and the Biosphere "Microbios-2018". Omsk, 2018;14-15. (In Russian).

References

1. Shkarin VV, Blagonravova AS. Terms and definitions in epidemiology. Nizhny Novgorod: NGMA Publishing House, 2015. (In Russian).
2. Tarasevich IV, Fetisova NF, Kovtunov AI. Tick-borne rickettsiosis and climate. Climate change and health of the population of Russia in the 21st century: collection of materials from the international seminar. Ed. by Izmerov NF et al. Moscow, 2004;138-143. (In Russian).
3. Shtrek SV, Rudakov NV, Shpynov SN, Sannikov AV, Samoylenko IE, Shchuchinova LD, et al. Genotyping of rickettsias circulating in the territories of the Altai Republic and Khabarovsk krai. Russian Journal of Infection and Immunity. 2023;13(1):100-106. DOI: 10.15789/2220-7619-GOR-2014 (In Russian).

Информация о соавторе:

Рудаков Николай Викторович, доктор медицинских наук, профессор, директор Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России

Information about co-author:

Nikolay V. Rudakov, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections of Rospotrebnadzor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology of Omsk State Medical University

НОВОСТИ НАУКИ

Нематоды против бактерий

Центральная нервная система координирует периферические клеточные реакции на стресс, включая развернутый белковый ответ митохондрий (UPRMT); однако контексты, для которых развилась эта регуляторная способность, неизвестны. UPRMT повышается при патогенной инфекции и в метаболическом потоке, и было показано, что обонятельная нервная система регулирует устойчивость к патогенам и периферическую метаболическую активность. Поэтому мы задались вопросом, контролирует ли обонятельная нервная система у *Caenorhabditis elegans* клетку UPRMT неавтономно. Мы обнаружили, что подавление одной пары ингибирующих обонятельных нейронов, AWC, привело к устойчивой индукции UPRMT и снижению окислительного фосфорилирования, зависящего от сигнализации серотонина и опосредованной паркином митофагии. Кроме того, абляция AWC придает устойчивость к патогенным бактериям *Pseudomonas aeruginosa*, частично зависящую от фактора транскрипции UPRMT *atfs-1* и полностью зависящую от механизма митофагии. Эти данные иллюстрируют роль обонятельной нервной системы в регуляции динамики митохондрий всего организма, возможно, в подготовке к постпрандиальному метаболическому стрессу или патогенной инфекции.

Dishart JG, Pender CL, Shen K, Zhang H, Ly M, Webb MB, et al.
Olfaction regulates peripheral mitophagy and mitochondrial function.
Sci Adv. 2024 Jun 21;10(25):eadn0014. DOI: 10.1126/sciadv.adn0014



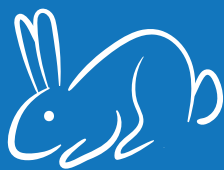
ЭКОлаб

производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов

ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ



Высокая специфичность
Не дают перекрестных реакций



Сыворотки получены на базе собственного вивария



Удобное применение
Сухие и жидкие формы



Быстрый результат:
через 2-3 минуты

Сыворотки диагностические сальмонеллезные

125 наименований

Сыворотки диагностические эшерихиозные

107 наименований

Сыворотки диагностические шигеллезные

49 наименований

Сыворотки диагностические менингококковые

9 наименований

- ✓ Все комплекты иммунных сывороток получены на базе имеющегося у предприятия вивария
- ✓ Контроль качества продукции осуществляется с помощью собственного музея патогенных микроорганизмов
- ✓ Все сыворотки имеют РУ РЗН



г. Электрогорск
ул. Буденного, д.1



ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru
8-800-333-33-47

Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org