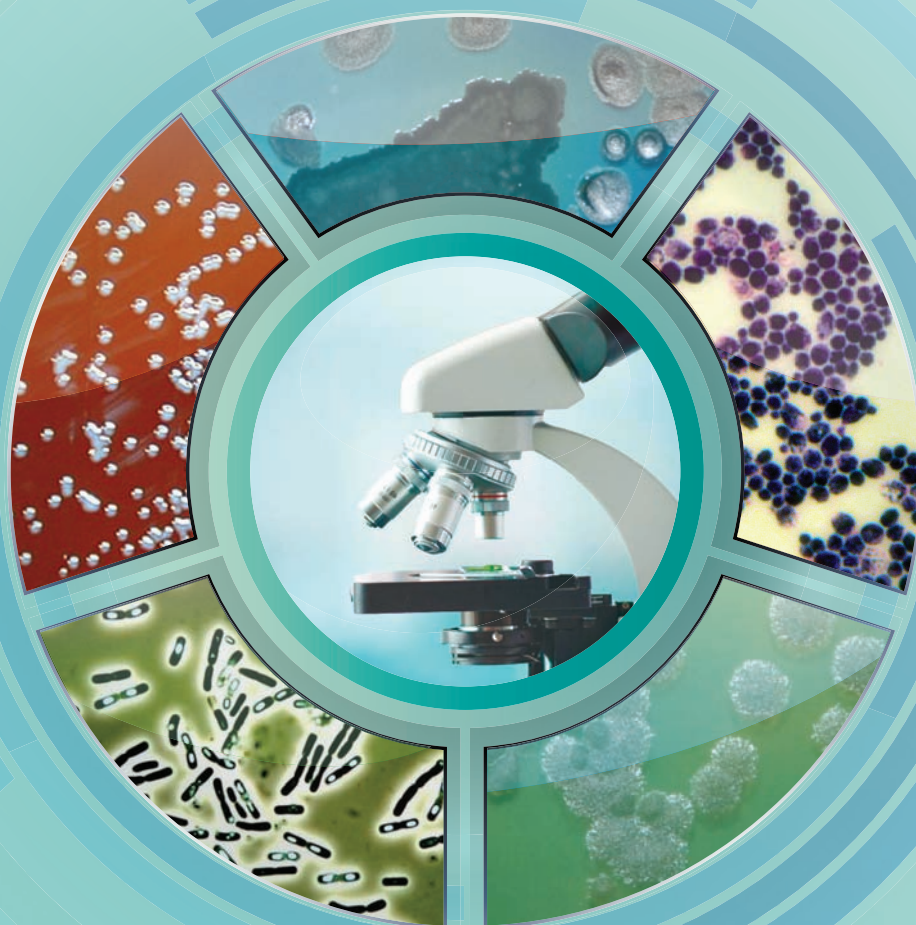


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2025 • том 10 • №1

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Н а у ч н о - п р а к т и ч е с к и й ж у р н а л

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)	В.В.Помазанов, д.т.н., проф. (Россия)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	Т.В.Припутневич, член-корр. РАН, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	А.В.Ракин, к.м.н. (Германия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.б.н., проф. (Великобритания)	О.Е.Хохлова, д.б.н., доцент (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
М.Н.Косой, к.б.н. (США)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
	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 31.03.2025

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

Достижения в вакцинологии по созданию средств специфической профилактики опасных инфекций	5
---	---

Экспериментальные статьи

Изучение антитоксических свойств моноклонального антитела к летальному фактору и его вклад в токсин-нейтрализующее действие сибиреязвенного токсина Т.А.Иващенко, Я.О.Романенко, А.С.Карцева, М.В.Силкина, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, М.А.Шкуратова, А.Е.Хлынцева, Т.И.Комбарова, В.В.Фирстова	8
Определение серотипа <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на основе данных полногеномного секвенирования А.А.Ковалевич, Р.В.Писанов, А.С.Водопьянов	17
Формирование устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к препаратам на основе серебра С.Э.Ржеусский, Т.Ф.Черных, Ю.А.Буковская, О.Ю.Богданова	26
Влияние времени замораживания на качество лиофилизатов диагностических чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов А.В.Комиссаров, Г.Н.Гиненко, Е.А.Глазкова, М.В.Овчинникова, О.А.Лобовикова, С.А.Бадарин, Д.Н.Бибилов, Н.В.Синицына, О.С.Зинина, Ю.В.Синягина, К.С.Гумаюнова, Н.И.Костылева, А.К.Никифоров	30
Стабильность свойств вакцинного сибиреязвенного штамма СТИ-1 при длительном хранении Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, Г.М.Титарева, И.А.Дятлов	35
Гены резистентности к бета-лактамам антибиотикам бактерий <i>Klebsiella pneumoniae</i> О.Н.Колотова, Л.В.Катаева, Т.Ф.Степанова	44
Аллельные варианты локусов гена <i>r66</i> у изолятов от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев возбудителя иксодового клещевого боррелиоза <i>Borrelia bavariensis</i> , циркулирующего в природных очагах среднего Урала К.А.Голитонов, Э.И.Коренберг, Ю.В.Ковалевский, Н.Б.Горелова, В.А.Матросова	50
Молекулярная динамика формирования биопленки в качестве носителя эндогенных дефензинов в биопленках с антибиотикорезистентными бактериями Ф.И.Базиков, А.А.Глушко, И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, А.А.Ефременко, Е.И.Дискаева	58
Оценка эффективности фаговых коммерческих препаратов в отношении клинических штаммов бактерий О.В.Азовская, Р.П.Терехова, С.А.Прудникова	63
Влияние низина на ростовые параметры и биопленкообразующую активность штаммов <i>Enterococcus faecalis</i> , изолированных из ротовой полости Д.С.Пантелеев, А.П.Годовалов, М.В.Яковлев	71
Распространенность бактерионосительства фагорезистентных штаммов <i>S. aureus</i> среди обучающихся медицинского вуза Т.В.Рукосуева, О.В.Перьянова, И.Т.Решетнева, Д.В.Быкова, А.С.Смолик	75
Сравнительная оценка гуморального иммунитета против <i>Francisella tularensis</i> методами реакции агглютинации и иммуноферментного анализа Т.В.Гапелъченкова, В.М.Павлов, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова, Т.И.Комбарова	82
Пути снижения уровня контаминации биологического материала при посеве на плотные питательные среды, используемые для выделения микобактерий туберкулезного комплекса И.В.Сидоров, Р.А.Шарипов, Ш.Э.Булатов, Л.Р.Галеева, Д.Р.Гадельмурзина, Р.Н.Исламов	87
Набор штаммов бактерий для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы Е.В.Растунцева, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов, О.Ю.Ляшова	91
Частота обнаружения грибов рода <i>Fusarium</i> у пациентов с заболеваниями кожи и слизистых оболочек П.Е.Гуляев, С.А.Лисовская, Г.Ш.Исаева	100

Обзор

Характеристика и клиническое значение бактерий <i>Raoultella</i> spp. О.М.Соболева, А.С.Кравченко	105
--	-----

Краткие сообщения

Геномы штаммов <i>Listeria monocytogenes</i> , выделенных от пациентов с инвазивными формами листериоза и из пищевых продуктов М.В.Фурсов, А.Е.Соломенцева, Л.А.Шишкина, К.В.Детушев, Т.Н.Мухина, А.И.Козлов, Н.А.Сухаричева, А.А.Кисличкина, Е.А.Алексеева, Н.К.Фурсова	112
Геномные последовательности изолятов <i>Acinetobacter baumannii</i> и <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных из крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии в 2024 году Л.В.Колупаева, Н.В.Колупаева, А.Ю.Лебедева, В.И.Соломенцев, А.А.Сизова, М.В.Фурсов, Е.Б.Лазарева, Т.В.Черненькая, А.В.Попова, Н.В.Воложанцев	116
XI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» – 29 ноября 2024 г. Орехово-Зуево – Электрогорск	119

Юбилей

Леонид Иванович Маринин (к 90-летию со дня рождения)	122
--	-----

Правила оформления статей (основные положения)	123
--	-----

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

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

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

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

Editorial Board

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

Advances in Vaccinology in the creation of means of specific prevention of dangerous infections	5
---	---

Experimental Articles

Study of antitoxic properties of monoclonal antibody to lethal factor and its contribution to toxin-neutralizing effect of anthrax toxin <i>T.A.Ivashchenko, Ya.O.Romanenko, A.S.Kartseva, M.V.Silkina, M.A.Marin, M.M.Rogozin, M.A.Shkuratova, A.E.Khlyntseva, T.I.Kombarova, V.V.Firstova</i>	8
Determination of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> serotype based on whole-genome sequencing data <i>A.A.Kovalevich, R.V.Pisanov, A.S.Vodopyanov</i>	17
Formation of resistance of gram-negative microorganisms to silver-based drugs <i>S.E.Rzheussky, T.F.Chernykh, Yu.A.Bukovskaya, O.Yu.Bogdanova</i>	26
Effect of freezing time on lyophilisate quality of diagnostic plague and pseudotuberculosis bacteriophages <i>A.V.Komissarov, G.N.Ginenko, E.A.Glazkova, M.V.Ovchinnikova, O.A.Lobovikova, S.A.Badarin, D.N.Bibikov, N.V.Sinitsyna, O.S.Zinina, Yu.V.Sinyagina, K.S.Gumayunova, N.I.Kostyleva, A.K.Nikiforov</i>	30
Stability of properties of the anthrax vaccine strain STI-1 during long-term storage <i>L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, G.M.Titareva, I.A.Dyatlov</i>	35
Genes of resistance to beta-lactam antibiotics of <i>Klebsiella pneumoniae</i> bacteria <i>O.N.Kolotova, L.V.Kataeva, T.F.Stepanova</i>	44
Allelic variants of the <i>p66</i> gene loci in isolates from small mammals – reservoir hosts of the tick-borne borreliosis agent <i>Borrelia bavariensis</i> circulating in natural foci of the middle Urals <i>K.A.Golidonova, E.I.Korenberg, Yu.V.Kovalevskii, N.B.Gorelova, V.A.Matrosova</i>	50
Molecular dynamics of niosome formation as endogenous defensin transporter in biofilms with antibiotic-resistant bacteria <i>F.I.Bazikov, A.A.Glushko, I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, A.A.Efremenko, E.I.Diskaeva</i>	58
Evaluation of the effectiveness of phage commercial drugs in relation to clinical strains of bacteria <i>O.V.Azovskova, R.P.Terekhova, S.A.Prudnikova</i>	63
Effect of nisin on growth parameters and biofilm-forming activity of <i>Enterococcus faecalis</i> strains isolated from the oral cavity <i>D.S.Panteleev, A.P.Godovalov, M.V.Yakovlev</i>	71
Prevalence of carriage of phage-resistant <i>S. aureus</i> strains among medical school student <i>T.V.Rukosueva, O.V.Peryanova, I.T.Reshetneva, D.V.Bykova, A.S.Smolik</i>	75
Comparative evaluation of humoral immunity against <i>Francisella tularensis</i> by agglutination and elisa <i>T.V.Gapelchenkova, V.M.Pavlov, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova, T.I.Kombarova</i>	82
Ways to reduce the level of contamination of biological material samples when seeding on solid nutrient media used to isolate mycobacteria of the tuberculosis complex <i>I.V.Sidorov, R.A.Sharipov, Sh.E.Bulatov, L.R.Galeeva, D.R.Gadel'murzina, R.N.Islamov</i>	87
A set of bacterial strains for training in microbiology and laboratory diagnostics of anthrax <i>E.V.Rastuntseva, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov, O.Yu.Lyashova</i>	91
Frequency of detection of <i>Fusarium</i> fungi in patients with skin and mucous membrane diseases <i>P.E.Gulyaev, S.A.Lisovskaya, G.Sh.Isaeva</i>	100

Review

Characteristics and clinical significance of <i>Raoultella</i> spp. bacteria <i>O.M.Soboleva, A.S.Kravchenko</i>	105
---	-----

Краткие сообщения

Genomes of <i>Listeria monocytogenes</i> strains isolated from patients with invasive listeriosis and from foods <i>M.V.Fursov, A.E.Solomentseva, L.A.Shishkina, K.V.Detushhev, T.N.Mukhina, A.I.Kozlov, N.A.Suharicheva, A.A.Kislichkina, E.A.Alekseeva, N.K.Fursova</i>	112
Genomic sequences of <i>Acinetobacter baumannii</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates obtained from the blood of patients of intensive care unit in 2024 <i>L.V.Kolupaeva, N.V.Kolupaeva, A.Yu.Lebedeva, V.I.Solomentsev, A.A.Sizova, M.V.Fursov, E.B.Lazareva, T.V.Chernenkaya, A.V.Popova, N.V.Volozhantsev</i>	116
XI All-Russian scientific and practical conference with international participation "Prospects for the implementation of innovative technologies in medicine and pharmacy" – November 29, 2024 Orekhovo–Zuyevo – Elektrogorsk	119

Jubilee

Leonid Ivanovich Marinin (on the 90th anniversary of his birth)	122
---	-----

Instructions for Authors	123
------------------------------------	-----

Достижения в вакцинологии по созданию средств специфической профилактики опасных инфекций

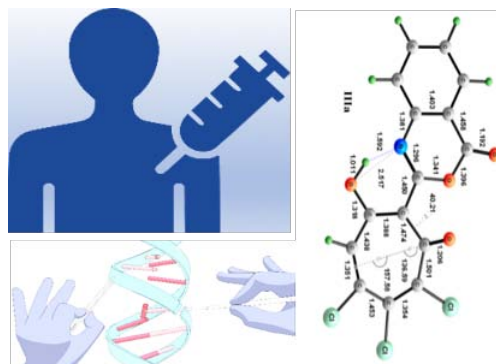
Современное состояние проблемы безопасности страны характеризуется интенсивным разработками, ведущимися в мире не только в оборонной сфере (ядерной, ракетной и др.), но и в области биологических исследований, в основном в результате внедрения в практику научных разработок эффективных методов генетического обмена и редактирования генома. Результаты, которые могли быть получены 20–30 лет назад за несколько лет или вообще не получены, сейчас достигаются в течение нескольких недель. Положение осложняется еще и тем, что мы не имеем представления об уровне соответствующих разработок в лабораториях развитых стран, и ограничениями в доступе к современным материалам, реагентам и оборудованию.

В отношении опасных, в особенности высококонтагиозных, бактериальных инфекций основным направлением в обеспечении биологической безопасности следует признать создание средств специфической профилактики – вакцин, иммуноглобулинов, купирующих токсические состояния и блокирующих другие факторы вирулентности (например, ферменты), к которым относятся в настоящее время инновационные терапевтические человеческие моноклональные антитела, а также биологических средств уничтожения патогенных бактерий, отличных от антибиотиков (фаговые ферменты, бактериоцины, дефензины и др.), которые могут быть использованы или самостоятельно, или в сочетании с другими антибактериальными средствами.

ФБУН ГНЦ ПМБ в последнее десятилетие ведет интенсивные разработки средств специфической профилактики особо опасных бактериальных инфекций, т.е. первого эшелона защиты от патогенов, значимых в биологической безопасности. Долгое время до начала данных исследований такие средства не разрабатывались по ряду причин – противодействие данному направлению США в рамках международных программ, недостаток финансирования, отсутствие заделов. Основная концепция данного направления – кто занимается иммунопатогенезом, тот занимается вирулентностью. Таким образом, данное направление является приоритетным в создании средств обеспечения биологической безопасности. К особенностям и преимуществам современных субъединичных генно-инженерных вакцин следует отнести их низкую, по сравнению с живыми, реактогенность и отсутствие нежелательных отдаленных последствий после применения, возможность использования в качестве средств экстренной профилактики, в т.ч. в условиях применения превентивной антибиотикотерапии, возможность аэрозольного применения для форм инфекционных болезней, для которых парентеральное введение не эффективно, возможность использования различных адъювантов, усиливающих протективность, возможность использования средств доставки к целевым органам, возможность использования вместе с наночастицами для повышения эффективности и др.

Для ускоренного создания средств специфической профилактики опасных инфекционных заболеваний при возникновении эпидемиологических осложнений во ФБУН ГНЦ ПМБ разработан ряд платформенных решений, позволяющих создавать вакцинные препараты современного уровня на основе подготовленных генетических конструкций и антигенов. К разработанным платформам относятся: живые прецизионно аттенуированные вакцины, субъединичные белковые или гликопротеидные вакцины, субъединичные полисахаридные вакцины, бактериальные тени, везикулы, наноккомпартаменты или инкапсулины. Сочетание платформ позволяет существенно повысить специфическую эффективность антибактериальных вакцин.

Всего в мире для создания бактериальных вакцин используется порядка десяти платформ: живые аттенуированные бактерии, живые рекомбинантные бактерии, на основе цельноклеточного антигена, субъединичные, в т.ч. на основе анатоксинов, полисахаридные единичные или конъюгированные, везикулы бактерий, бактериальные тени, на основе плазмидных ДНК, на основе вирусных или бактериальных векторов и некоторые другие. В последнее время значительно интенсифицировались разработки с использованием наноча-



стиц в качестве компонентов вакцин. В частности, используются наночастицы с хитозаном, с оксидом цинка, кремнеземные, наносферы поли-со-гликолевой кислоты, на основе полиангидрида S и наночастиц желтого карнаубского воска. В основном попытки создания вакцин с наночастицами предпринимаются в отношении туберкулеза, некоторых особо опасных инфекций (чума, сибирская язва) и кишечных патогенов. Что касается вакцин на основе мРНК, то такие попытки предпринимаются, но в отношении бактериальных инфекций они пока малоэффективны в силу сложности индукции протективности, когда нужно получить иммунный ответ не на один, а на комплекс антигенов. Имеется сообщение только об одной успешной антибактериальной мРНК-вакцине против «опасной бактерии», разработанной израильскими учеными, однако не ясно, какая именно вакцина имеется в виду.

О фактических достижениях по разработке вакцин против особо опасных инфекций в западных странах сведений крайне мало, что связано с закрытием большинства гражданских грантов в США начиная примерно с 2012 г. и перенесением исследований в учреждения Минобороны. Есть сведения только о разработке в мире четырех противоэшерихиозных вакцин (на разных стадиях доклиники и клиники), создание которых настоятельно рекомендует Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Кроме того, есть сведения о разработках рекомбинантных бруцеллезных вакцин в Китае, Казахстане и США.

Генно-инженерными методами в ГНЦ ПМБ получен трехкомпонентный препарат прототипа чумной вакцины, состоящий из капсульного антигена, модифицированного V-антигена и теней клеток с интегрированными в клеточную стенку белками, значимыми в иммуногенезе. Доклинические исследования на мелких животных показали высокую эффективность и безопасность данной вакцины при двукратном введении. В декабре 2024 г. закончены клинические исследования на крупных животных – павианах гамадрилах. В результате испытаний вакцины ни одно из опытных животных из трех групп не только не пало от чумы, но и не проявило признаков заболевания или плохого самочувствия. Контрольные зараженные животные пали от чумы на 3–4-е сутки. Данные острые опыты по определению протективности на обезьянах проводились в филиале 48 НИИ МО (г. Киров) силами его сотрудников.

Таким образом, был получен высокоэффективный препарат чумной вакцины, который может со временем заменить живую вакцину EV чумного микроба или использоваться для ревакцинации после ее первичного введения. В мировой литературе субъединичные противочумные вакцины с таким уровнем эффективности не описаны. Дальнейшие разработки будут связаны с клиническими испытаниями препарата, созданием систем контроля стандартности компонентов, оптимизацией производственных процессов и регистрацией вакцины и изучением тактики ее применения.

Субъединичную вакцину против туляремии до настоящего времени в мире получить не удалось, хотя уже несколько десятилетий в этом направлении работает ряд специализированных групп исследователей. В ГНЦ ПМБ разработан препарат живой улучшенной вакцины на основе вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Генно-инженерными методами в штамме устранены гены, вызывающие нестабильность популяции, что при производственных процессах приводило к накоплению низкоиммуногенных R-вариантов, а также элиминированы два из четырех генов супероксиддисмутазы, что способствовало существенному снижению реактогенности живой вакцины. Исследование трех серий препаратов в доклинических исследованиях на мелких животных и павианах гамадрилах показало их высокую эффективность. Необходимы клинические исследования новой живой вакцины, разработка и оптимизация масштабного производства препарата, усовершенствование методов контроля и стандартизации, регистрация препарата. Не должна оставаться без внимания и проблема создания субъединичной туляремийной вакцины.

Основным компонентом экспериментальной субъединичной противосибиреязвенной вакцины ВССА (вакцина сибиреязвенная субъединичная адсорбированная), разработанной в ГНЦ ПМБ, является гибридный белок rLF1PA4, состоящий из доменов протективного антигена и летального фактора сибиреязвенного микроба, сорбированный на гидроокиси алюминия. Вспомогательный компонент, усиливающий протективность основного специфического слитного белка, – рекомбинантный белок OmpA *Shigella flexneri*. Исследования протективности проводились на моделях морских свинок и золотистых хомячков при двукратной вакцинации с дозировкой белков 100 мкг белка основного компонента на животное. Протективность при заражении двухплазмидным штаммом *Bacillus anthracis* 71/12 (в соответствии с требованиями к испытанию вакцин) в дозе 10^5 спор/животное для морских свинок и $5 \cdot 10^4$ для хомячков. Выживаемость животных составляла 90%, что предварительно показывает высокую эффективность разработанной вакцины. Необходимые доклинические исследования уже начаты в 2025 г. на мелких животных (хомячках, свинках, кроликах) и в дальнейшем будут проводиться на павианах гамадрилах. В последующем необходимы клинические испытания, разработка масштабных процессов производства, создание систем контроля и стандартизации, регистрация препарата.

Впервые в мире в ГНЦ ПМБ разработан прототип эффективной вакцины против эшерихиозов, сконструированной по модульному типу. Вакцина содержит компоненты полисахаридов энтерогемморагического штамма O157:H7 и энтероаггративного O104:H4, а также генно-инженерный антитоксический компонент токсина 2-го типа, содержащего A- и B-субъединицы (Stx2AB – слитный белок). Эффективность вакцины про-

тив данных штаммов, имеющих высокую значимость для биологической безопасности, составляет 100% на лабораторных животных. Кроме того, эксперименты показали, что препарат эффективен и против других серовариантов эшерихиозов, несущих токсин 2-го типа, – O26:H11, O181:H4 и некоторых других. По-видимому, это связано с блокированием действия токсина и предотвращением адгезии клеток к энтероцитам благодаря синергическому действию противополополисахаридных антител к другим серовариантам. В вакцине, благодаря модульному принципу, могут быть изменены полисахаридные компоненты в зависимости от штамма, вызвавшего эпидемические осложнения. В 2025 г. начаты доклинические испытания на мелких животных, которые необходимо продолжить, а затем провести испытания на крупных животных и клинические исследования.

Прототипы субъединичных вакцин против чумы, сибирской язвы и эшерихиозов являются инновационными, получены впервые в мире, проявляют высокую протективную активность, низкореактогенны, безопасны, могут быть использованы одновременно с превентивной профилактикой антимикробными средствами, что позволяет считать необходимым их внедрение в практику для обеспечения биологической безопасности страны.

Уже накопленный опыт, разработанные технологические платформы – технологии получения субъединичных рекомбинантных вакцин, а также наличие подготовленных для реализации данного направления генных инженеров позволяют утверждать, что линейка вакцинных препаратов против особо опасных бактериальных инфекций должна быть непременно расширена. В этой связи представляется важным создание современных вакцин против бруцеллеза, сапа, мелиоидоза, холеры, легионеллеза (относится к III группе патогенности, но в силу патогенного потенциала представляет значительную опасность) и некоторых других инфекций.

В отношении бруцеллеза в ГНЦ ПМБ ведутся работы по созданию прототипа рекомбинантной вакцины нового поколения методами обратной вакцинологии. Разработка находится в начальной стадии развития. Получено 58 рекомбинантных единичных и слитых белков бруцелл, а также мультисубъединичный белок MEV1. В Государственной коллекции ГНЦ ПМБ депонированы 188 рекомбинантных экспрессионных штаммов *Escherichia coli* и *Pichia pastoris*. Проведены лабораторные испытания на животных по оценке иммуногенности 47 белков. Проводятся лабораторные испытания на животных по оценке протективности четырех коктейлей из 20 белков бруцелл. Проводятся исследования по получению оптимальных штаммов-продуцентов иммунодоминантных антигенов на основе различных микроорганизмов и генетических конструкций.

Одно из направлений исследований для ускоренной разработки вакцин связано с созданием банка генетических конструкций для реализации вакцинных платформ и свода методологий быстрой разработки средств специфической профилактики. Данная задача состоит из нескольких мероприятий. Это создание коллекции генетических инструментов для разработки вакцин, свод методологий; создание на базе Государственной коллекции ГНЦ ПМБ банка генов и продуцентов протективных антигенов патогенных микроорганизмов и банка тотальных ДНК микроорганизмов I–IV групп патогенности; создание в рамках «Национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов» раздела по генетическим конструкциям и продуцентам для учреждений разработчиков вакцин, банка данных факторов патогенности и их продуктов; создание пилотных технологий производства вакцин; создание пилотных технологий наработки препаративных количеств поливалентных кандидатных живых и химических вакцин, в т.ч. на основе векторных штаммов *F. tularensis*, предназначенных для профилактики инфекций, вызванных внутриклеточными патогенами; наработка препаративных количеств компонентов поливалентных кандидатных вакцин, предназначенных для профилактики инфекций; создание экспериментальных животных моделей для воспроизведения актуальных инфекционных болезней.

Как показывают исследования последних лет в ГНЦ ПМБ в области иммунопрофилактики, наиболее эффективным методом конструирования рекомбинантных субъединичных вакцин является сочетание нескольких платформ для достижения максимального протективного эффекта.

Наиболее значимым результатом в данной области является создание прототипа полисахаридной вакцины против *Klebsiella pneumoniae* капсульных типов K2, K1, K57 в сочетании с клеточными теньями и конъюгированной полисахаридной бивалентной вакцины против *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*, также в сочетании с теньями клеток. Особенное значение в постковидный период приобретает разработка (настоятельно рекомендуемая ВОЗ) клебсиеллезной вакцины, так как значительно увеличилось количество вызываемых данным возбудителем инфекций, усилилась вирулентность и значительно возросла резистентность к антибиотикам.

Таким образом, для обеспечения биологической безопасности страны в современный период необходимо интенсифицировать научно-исследовательские разработки в области вакцинологии, осуществляемые с использованием новых генно-инженерных методологий, и обеспечить внедрение их результатов в производство, практику здравоохранения и комплекс мероприятий по защите населения от инфекций.

Изучение антитоксических свойств моноклонального антитела к летальному фактору и его вклад в токсин-нейтрализующее действие сибиреязвенного токсина

Т.А.Иващенко, Я.О.Романенко, А.С.Карцева, М.В.Силкина, М.А.Марьин, М.М.Рогозин,
М.А.Шкуратова, А.Е.Хлынцева, Т.И.Комбарова, В.В.Фирстова

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

Одним из способов нейтрализации летального токсина (ЛТ) сибирской язвы является применение специфических к нему моноклональных антител (МКА). В данном исследовании для нейтрализации ЛТ нами была предложена композиция, состоящая из МКА 1E10, специфичного к IV домену протективного антигена (ПА), и МКА 2D8, специфичного к I домену летального фактора (ЛФ).

Цель. Изучение антитоксического действия МКА 2D8, специфичного к ЛФ, отдельно и совместно с МКА 1E10.

Материалы и методы. Субъединицы ЛТ – полноразмерные ПА и ЛФ *B. anthracis* были получены в прокариотической системе экспрессии. Для получения необходимого количества МКА гибридомы 1E10 и 2D8 культивировали в организме мышей до появления асцитных опухолей. МКА из асцитической жидкости выделяли посредством аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose. Оценку токсин-нейтрализующей активности антител проводили как *in vitro*, в МТТ-тесте с использованием клеточной линии макрофагов мыши J774A.1, так и *in vivo* с использованием мышей линии BALB/c.

Результаты. В экспериментах *in vitro* было показано, что предложенная композиция МКА 1E10 и 2D8 способна нейтрализовать действие ЛТ в количестве IC100 на 98%. В эксперименте *in vivo* МКА 2D8 обеспечивало 60% выживаемость мышей.

Заключение. МКА 2D8, специфичное к I домену ЛФ, может представлять собой дополнительный потенциальный инструмент для терапии сибиреязвенной инфекции. Поскольку IV домен ПА играет ведущую роль в связывании с рецепторами на поверхности эукариотических клеток, а I домен ЛФ необходим для проникновения ЛФ внутрь клетки, то можно предположить, что совместное применение МКА 1E10 и 2D8 позволит блокировать как проникновение токсина внутрь клетки, так и сборку ЛТ.

Ключевые слова: летальный токсин, моноклональные антитела, протективный антиген, летальный фактор

Для цитирования: Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Рогозин М.М., Шкуратова М.А., Хлынцева А.Е., Комбарова Т.И., Фирстова В.В. Изучение антитоксических свойств моноклонального антитела к летальному фактору и его вклад в токсин-нейтрализующее действие сибиреязвенного токсина. Бактериология. 2025; 10(1): 8–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-8-16

Study of antitoxic properties of monoclonal antibody to lethal factor and its contribution to toxin-neutralizing effect of anthrax toxin

T.A.Ivashchenko, Ya.O.Romanenko, A.S.Kartseva, M.V.Silkina, M.A.Marin, M.M.Rogozin,
M.A.Shkuratova, A.E.Khlyntseva, T.I.Kombarova, V.V.Firstova

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

One of the ways in neutralizing anthrax lethal toxin is the use of monoclonal antibodies (MAb) specific to LT subunits. In this study, we proposed a composition consisting of MAb 1E10 specific to the IV domain of PA and MAb 2D8 specific to the I domain of LF.

Для корреспонденции:

Иващенко Татьяна Александровна, кандидат биологических наук,
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) 36-00-46
ORCID: 0000-0002-4908-2524

Статья поступила 05.11.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Tatiana A. Ivashchenko, PhD in Biological Sciences, Researcher
of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied
Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov,
Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-46
ORCID: 0000-0002-4908-2524

The article was received 05.11.2024, accepted for publication 31.03.2025

Objective. Of this study was to study the antitoxic effect of LF-specific MAb 2D8 alone and together with MAb 1E10.

Materials and methods. The subunits of LT, full-length protective antigen (PA) and lethal factor (LF). *B. anthracis* were obtained in a prokaryotic expression system. To obtain the required amount of MAb, hybridomas 1E10 and 2D8 were cultured in mice until ascitic tumors appeared. MAb from ascitic fluid were isolated by affinity chromatography on a column with Protein G Sepharose sorbent. The toxin-neutralizing activity of antibodies was evaluated both in vitro and in vivo in MTT test using mouse macrophage cell line J774A.1 using BALB/c mice.

Results. In *in vitro* experiments it was shown that the proposed composition of MAb 1E10 and 2D8 was able to neutralize the effect of LT in the amount of IC₁₀₀ by 98%. In the *in vivo* experiment, MAb 2D8 provided 60% survival rate of mice.

Conclusion. Thus, MAb 2D8 specific to the I domain of LF may represent an additional potential tool for the therapy of anthrax infection. Since the IV domain of PA plays a leading role in binding to receptors on the surface of eukaryotic cells, and the I domain of LF is required for LF penetration into the cell interior, it is conceivable that co-administration of MAb 1E10 and 2D8 may block LT assembly.

Key words: lethal toxin, monoclonal antibodies, protective antigen, lethal factor

For citation: Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Rogozin M.M., Shkuratova M.A., Khlyntseva A.E., Kombarova T.I., Firstova V.V. Study of antitoxic properties of monoclonal antibody to lethal factor and its contribution to toxin-neutralizing effect of anthrax toxin. *Bacteriology*. 2025; 10(1): 8–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-8-16

Сибирская язва – зооантропонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями *Bacillus anthracis*, представляет серьезную проблему для ветеринарии и здравоохранения во многих странах мира [1]. Основными резервуарами возбудителя сибирской язвы являются контаминированная спорами почва или зараженные животные [2]. Вспышки сибирской язвы в России регистрируются спорадически. Например, в 2016 г. почти 100 человек были госпитализированы из-за вспышки сибирской язвы среди кочевых сообществ на севере Сибири, более 2300 северных оленей погибли от сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе. Единичные случаи заболевания ежегодно регистрируются в эндемичных регионах Российской Федерации. В марте 2022 г. было выявлено два случая заражения сибирской язвой. В Республике Дагестан был зарегистрирован один случай заболевания кожной формы сибирской язвы при убойе инфицированного животного. В июне этого же года в Ставропольском крае был зарегистрирован еще один такой же случай [3]. Совсем недавно в марте 2023 г. в Республике Чувашия было зарегистрировано 3 случая заражения кожной формой, а в июне этого же года в Республике Тыва зафиксирован второй случай заболевания [4].

Основным фактором патогенности *B. anthracis* является летальный токсин (ЛТ), состоящий из протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ). Каждый из компонентов по отдельности не обладает токсическими свойствами, а только при их сборке в единую структуру [5]. ПА и ЛФ представляют собой белки, каждый из которых состоит из 4 структурных доменов, выполняющих свою функцию в сборке ЛТ. На ранних стадиях сибиреязвенной инфекции в сублетальных дозах ЛТ подавляет реакции иммунных клеток, что приводит к ускоренному размножению бактерий. На поздних стадиях заболевания накопление ЛТ в кровяном русле приводит к развитию шокового состояния с последующим летальным исходом [6].

Вакцинация ежегодно проводится в эндемичных районах для людей и животных, что является неотъемлемой частью профилактики сибирской язвы [7]. Однако для поддержания стабильного иммунитета требуется регулярная вакцинация [8]. В подтвержденных случаях для лечения сибиреязвенной инфекции используют антибиотики, но на поздних стадиях

заболевания они не эффективны и не способны выводить из кровотока накопившийся токсин, что в дальнейшем приводит к развитию шокового состояния с последующим летальным исходом [9]. Таким образом, существует потребность в препаратах, в основу которых будут входить моноклональные антитела (МКА). МКА являются классом терапевтических средств, которые могут действовать строго специфично и способны блокировать сборку ЛТ [10].

ЛТ состоит из двух субъединиц: ПА и ЛФ. ПА связывается с рецепторами на поверхности эукариотической клетки и способствует проникновению ЛТ внутрь клетки, а в дальнейшем – ЛФ в цитозоль. Проникнув в цитозоль, ЛФ гидролизует внутриклеточные субстраты клеток организма хозяина, что и обуславливает проявление цитотоксичности ЛТ. Поэтому для эффективной стратегии лечения и профилактики сибиреязвенной инфекции эффективной является нейтрализация ПА и ЛФ одновременно.

В предыдущих исследованиях методом классической гибридомной технологии было получено и охарактеризовано МКА 1E10, специфичное к IV домену ПА [11]. Было показано, что МКА 1E10 нейтрализует активность ЛТ *in vitro* и *in vivo*. Целью данного исследования являлось изучение антитоксического действия МКА 2D8, специфического к ЛФ, отдельно и совместно с МКА 1E10.

Материалы и методы

Получение и очистка рекомбинантного летального токсина

Субъединицы рекомбинантных белков ЛТ *B. anthracis* – рекомбинантный (рПА) [10] и рекомбинантный (рЛФ) [12] были получены в прокариотической системе экспрессии. Продукты рекомбинантных белков получали, трансформируя штамм *E. coli* BL21(DE3) экспрессионными плазмидами pET22b – ПА, pET22b – ЛФ. Полученные трансформанты высевали на агарозную среду на основе 2xYT, содержащую 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, далее наращивали при 37°C в среде 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. В течение 6 ч проводили экспрессию белка с добавлением 0,4 мМ ИПТГ при 25°C. После экспрессии клетки были собраны центрифугированием с последующим лизированием. Очистку полученного лизата проводили на

колонке с Ni-сефарозой (Roche, Германия) с последующей доочисткой на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 (GE Healthcare, Великобритания). Эффективность очистки проверяли с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях.

Лабораторные животные

При проведении экспериментов были использованы мыши инбредной линии BALB/c (питомник «Пушино», ФИБХ РАН, Московская обл., г. Пушино). Масса мышей составляла 18–20 г, возраст – 6–8 нед. Мыши содержались по 5 особей в клетках типа «микроизолятор» в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 20–24°C, относительная влажность 35–40%, освещение в помещениях – искусственное, с фиксированным режимом день-ночь). В качестве подстилки использовали древесные опилки нехвойных пород, в качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ 50258-92 производства ООО «Лабораторкорм».

Получение и очистка МКА, специфичных к летальному токсину

Для получения МКА, специфичных к ЛФ сибиреязвенного токсина, мышей линии BALB/c иммунизировали по схеме: подкожно рЛФ в дозе 100 мкг/мышь с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), через 2 нед. животных повторно иммунизировали в дозе 100 мкг/мышь с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), спустя 2 нед. мышей реиммунизировали в дозе 10 мкг/мышь рЛФ без адъюванта. На 3-и сутки после последней иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов гипериммунных мышей (1×10^8 клеток) с партнером для слияния – клетками мышинной миеломной линии *Mus musculus* Sp2/0-Ag14 (1×10^7 клеток) методом электрослияния [13]. Таким образом была получена панель гибридом, из которой выбрано наиболее перспективное МКА 2D8, специфичное к ЛФ сибиреязвенного токсина.

Гибридомы, синтезирующие МКА, культивировали *in vivo*, для этого мышей линии BALB/c внутрибрюшинно обрабатывали пристаном (Sigma, США) по 0,5 мл и через 2–3 нед. интраперитонеально вводили по от 2×10^6 до 4×10^6 гибридные клетки 1E10, продуцирующие МКА, специфичные к ПА, и 2D8, продуцирующие МКА, специфичные к ЛФ. Сбор асцитической жидкости производили по мере созревания асцита на 7–15-е сутки. Выделение МКА из асцитической жидкости проводили методом аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose (GE Healthcare, Великобритания) с последующей доочисткой на колонке Superdex 200. Эффективность очистки проверяли с помощью электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях.

Характеристика полученного МКА 2D8, специфичного к ЛФ летального токсина.

Определение доменной и классовой принадлежности

Для определения доменной специфичности МКА 2D8 проводили иммуноблот с рекомбинантным белком ЛФ и I доменом ЛФ, слитым с глутатион-S-трансферазой (GST). Белки подвергали электрофорезу в 10% ПААГ, после чего

осуществляли горизонтальный перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare, Великобритания) в блоттере (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, США). После завершения переноса мембрану блокировали, погружая в обезжиренное молоко с массовой долей жира не более 0,5% и инкубируя в течение 1 ч на орбитальном термостатируемом шейкере при 300 об./мин и температуре 37°C. Далее мембрану отмывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,05% твин 20 (ФСБ-Т). Потом мембрану инкубировали с МКА 2D8 в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в течение 1 ч при температуре 37°C. После инкубации мембраны трехкратно отмывали буфером ФСБ-Т. Далее мембрану инкубировали с пероксидазным конъюгатом к суммарной фракции IgG мыши (Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma, США) в разведении 1 : 10 тыс., затем промывали ФСБ-Т четырехкратно. Визуализацию реакции проводили раствором субстратной смеси на основе диаминобензидина (0,05% диаминобензидина (Sigma, США), 0,015% H_2O_2 в ФСБ pH 7,4). Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, далее мембраны высушивали.

Подкласс МКА 2D8 определяли в иммунохроматографическом тесте с использованием коммерческого набора для определения изотипов мышинных моноклональных антител (Roche Diagnostic Corporation, США).

Определение токсин-нейтрализующей активности МКА *in vitro*

Токсин-нейтрализующую активность МКА в отношении ЛТ определяли в МТТ-тесте (Mosmann, 1983) на клеточной линии мышинных макрофагов J774 A.1. В лунки 96-луночного планшета вносили клетки в концентрации 2×10^4 на лунку в среде ДМЕМ с добавлением 10% ФБС и инкубировали 12 ч при 37°C и 5% CO_2 . Первоначально готовили разведение рекомбинантного ЛТ в концентрации, составляющей IC100. Было определено, что конечные концентрации ЛТ, используемые в эксперименте, приводящие к гибели 100% клеток, составили 0,8 мкг/мл рПА и 0,27 мкг/мл рЛФ.

МКА 1E10 и 2D8 брали в концентрациях 5 мкг/мл и титровали двукратным шагом до 0,07 мкг/мл. А также готовили коктейль МКА 1E10 и 2D8 в концентрациях 2,5 мкг/мл и титровали двукратным шагом до 0,04 мкг/мл. Компоненты ЛТ (ПА + ЛФ) в количестве IC100 добавляли к антителам с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. Далее приготовленные смеси добавляли в лунки планшета, содержащие макрофаги, и инкубировали 4 ч при 37°C и 5% CO_2 . В качестве положительного контроля использовали лунки без добавления токсина и МКА (достигая 100% жизнеспособных клеток). В качестве отрицательного контроля использовали и лунки с добавлением мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) в концентрации 0,024% (достигая 0% жизнеспособных клеток). По окончании инкубации во все лунки вносили по 10 мкл раствора МТТ (5 мкг/мл) в ФСБ и инкубировали еще 4 ч при тех же условиях. Затем в лунки планшета вносили по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения образовавшихся кристаллов формазана и измеряли сигнал при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark, США).

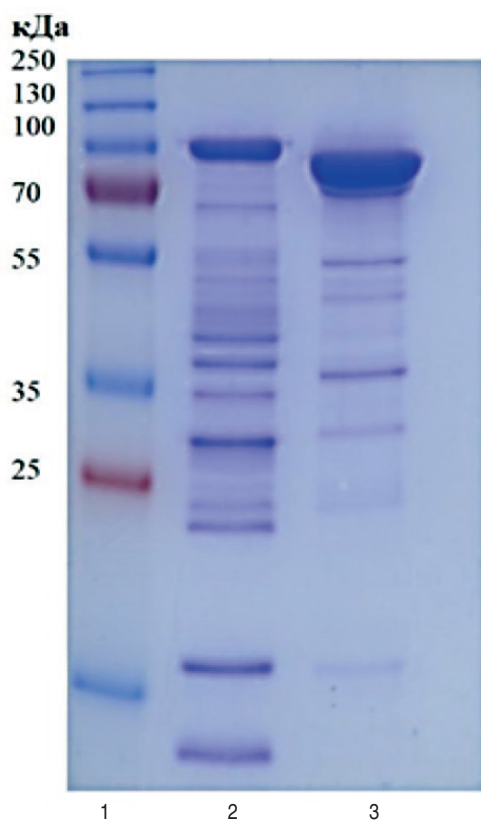


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантных белков ПА и ЛФ: 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США); 2 – рекомбинантный ЛФ (90,2 кДа); 3 – рекомбинантный ПА (83 кДа).

Fig. 1. Electrophoregram of recombinant PA and LF proteins: 1 – markers PageRuler™ SM1811 molecular mass markers (Fermentas, USA); 2 – recombinant LF (90.2 kDa); 3 – recombinant PA (83 kDa).

Определение LD₅₀ летального токсина и токсин-нейтрализующей активности МКА в эксперименте *in vivo*

Токсин-нейтрализующую активность определяли на мышах линии BALB/c (по 9 мышей в группе). Первым этапом определили LD₅₀ ЛТ, для этого готовили разведения ЛТ (рПА/рЛФ = 1/1), начиная с 24 мкг/мышь до 4 мкг/мышь с двукратным разведением и вводили в ретроорбитальную вену глаза. Контрольной группе мышей вводили раствор чистого ФСБ. Учет гибели животных проводили раз в сутки. Значение LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера.

$$LD_{50} = LD_{100} - S(Z \cdot D) / M, \text{ где}$$

D – интервал между каждыми двумя смежными дозами; Z – среднее арифметическое число животных, у которых наблюдалась учитываемая реакция; M – число животных в каждой группе.

Для определения защитной дозы МКА 2D8, специфичное к I домену ЛФ, по отдельности и в комплексе с МКА 1E10, специфичным к IV домену ПА, внутрибрюшинно вводили мышам линии BALB/c (по 9 голов в группе) 1 : 1 в разных дозах: 100 мкг/мышь, 50 мкг/мышь. Через 24 ч после введения антител мышей иммунизировали ретроорбитально в дозе 4LD₅₀ (48 мкг/мышь ЛТ, рПА/рЛФ = 1/1). Контрольная группа мышей получала инъекцию ЛТ в дозе LD₅₀ (6 мкг рПА/6 мкг ЛФ). Учет гибели животных проводили раз в сутки в течение 14 дней.

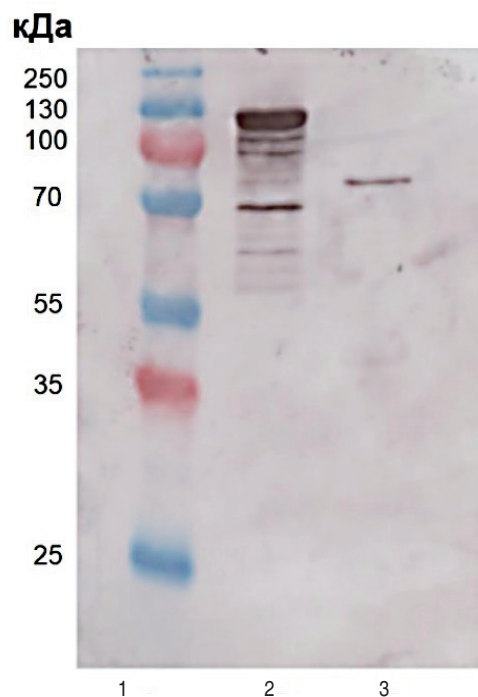


Рис. 2. Специфическая активность МКА 2D8 по отношению к рекомбинантному полноразмерному ЛФ I домену ЛФ *B. anthracis*: 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США); 2 – полноразмерный рекомбинантный ЛФ; 3 – рекомбинантный I домен ЛФ-GST.

Fig. 2. Specific activity of MCA 2D8 against the recombinant full-length LF I domain of *B. anthracis* LF: 1 – PageRuler™ SM1811 molecular weight markers (Fermentas, USA); 2 – full-length recombinant LF; 3 – recombinant I domain of LF.

Результаты исследования

Результаты получения и очистки рекомбинантного летального токсина

Субъединицы рекомбинантных белков ПА и ЛФ были получены в прокариотической системе экспрессии. Очистку проводили методом аффинной хроматографии на колонке с Ni – сефарозой (Roche, Германия) с последующей доочисткой методом гель-фильтрации, чистоту проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10% ПААГ. По результатам электрофореграммы видно, что очищенные рекомбинантные белки соответствуют своему молекулярному весу (рис. 1).

Результаты определения доменной специфичности МКА 2D8 к ЛФ

Доменную специфичность МКА 2D8 доказали методом иммуноблотинга. Было показано, что исследуемое МКА специфично к рекомбинантному I домену ЛФ (рис. 2).

Результаты хроматографической очистки МКА, специфичных к летальному токсину

Очистку МКА 1E10 и 2D8 проводили из асцитической жидкости методом аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose (GE Healthcare, Великобритания) с последующей доочисткой методом гель-фильтрации, чистоту проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10% ПААГ в денатурирующих и

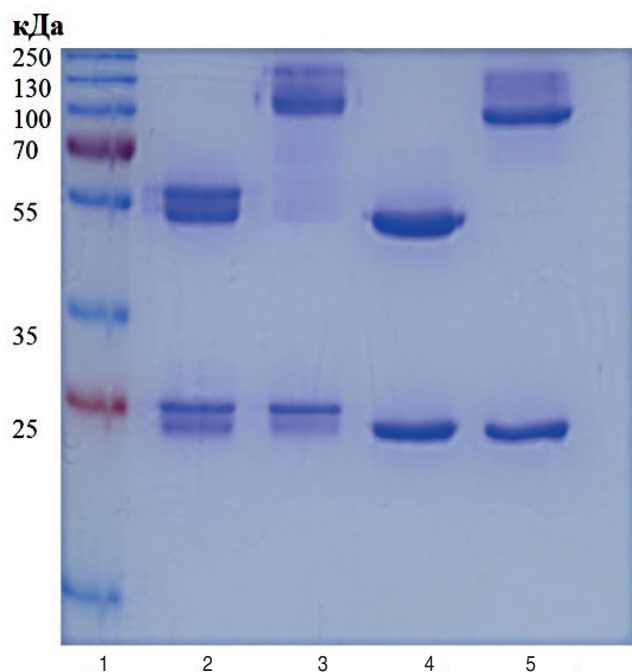


Рис. 3. Электрофореграмма МКА 1Е10, специфичного к ПА, и 2D8, специфичного к ЛФ: 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США); 2 – образец МКА 1Е10 в денатурирующих условиях; 3 – образец МКА 1Е10 в неденатурирующих условиях; 4 – образец МКА 2D8 в денатурирующих условиях; 5 – образец МКА 2D8 в неденатурирующих условиях.
Fig. 3. Electrophoregram of MCA 1E10 specific to PA and 2D8 specific to LF: 1 – PageRuler™ SM1811 molecular weight markers (Fermentas, USA); 2 – MCA 1E10 sample under denaturing conditions; 3 – MCA 1E10 sample under non-denaturing conditions; 4 – MCA sample 2D8 under denaturing conditions 5 – MCA 2D8 sample under non-denaturing conditions.

неденатурирующих условиях. По результатам электрофореграммы видно, что очищенные МКА 1Е10 и 2D8 соответствуют своему молекулярному весу. Степень чистоты по данным денситометрии (GE Typhoon FLA 9500, Швеция) составила не менее 95% (рис. 3).

Результаты определения классовой принадлежности МКА 2D8, специфичного к ЛФ

Результаты иммунохроматографического теста показали, что исследуемое МКА 2D8 относится к классу иммуноглобулинов G, изотипу G1 и имеет карпа цепь (рис. 4).

Результаты определения токсин-нейтрализующей активности МКА в отношении ЛТ *B. anthracis* в эксперименте *in vitro*

Токсин-нейтрализующая активность исследуемых МКА: 2D8, специфичного к I домену ЛФ, и 1Е10, специфичного к IV домену ПА, была определена в МТТ-тесте на клеточной линии макрофагов J 774 A.1. По результатам проведенного теста было показано, что МКА 2D8 в максимальной концентрации 5 мкг/мл нейтрализовало действие ЛТ (0,8 мкг/мл рПА и 0,27 мкг/мл рЛФ) в дозе IC100. Токсин-нейтрализующая активность составила 91%. В минимальной концентрации МКА 2D8 0,075 мкг/мл токсин-нейтрализующая активность составила 40%. МКА 1Е10 в максимальной концентрации 1,25 мкг/мл и выше нейтрализовало действие ЛТ в дозе IC100 на 93%, а в минимальной концентрации 0,075 мкг/мл

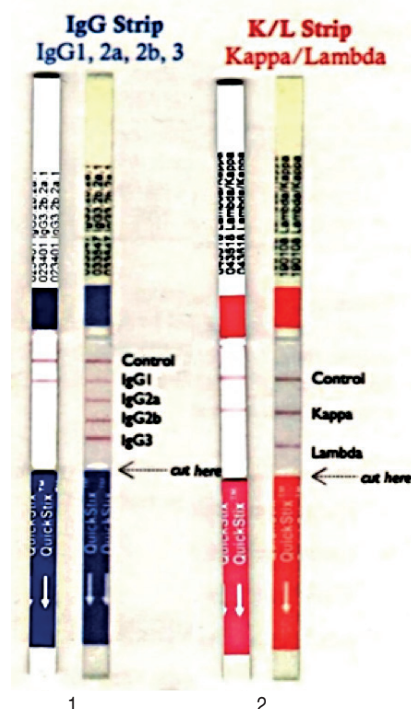


Рис. 4. Классовая принадлежность МКА 2D8: 1 – тест-полоска на определение класса цепей иммуноглобулина; 2 – тест-полоска на определение Кappa/Lambda цепей иммуноглобулина.
Fig. 4. Class affiliation of MCA 2D8: 1 – test strip for immunoglobulin chain class determination; 2 – immunoglobulin Kappa/Lambda chain detection test strip.

токсин-нейтрализующая активность составила 27%. Нейтрализующая активность комплексного использования МКА 2D8 и 1Е10 в концентрации 0,6 мкг/мл и выше составила 98%. В минимальной концентрации 0,075 мкг/мл нейтрализация ЛТ 35% (рис. 5).

Результаты определения токсин-нейтрализующей активности МКА в отношении ЛТ *B. anthracis* в эксперименте *in vivo*

Далее мы исследовали способность МКА 2D8 нейтрализовать действие ЛТ в экспериментах *in vivo* на мышинной модели. В нашем предыдущем исследовании были изучены протективные свойства МКА 1Е10 [11]. Было установлено, что введение МКА 1Е10 мышам линии BALB/c в количестве

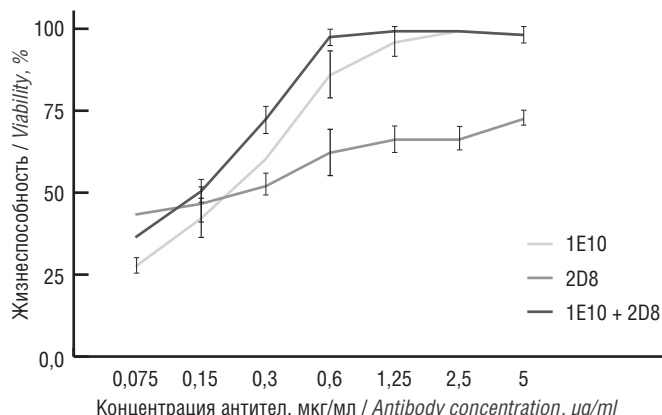


Рис. 5. Определение токсин-нейтрализующей активности МКА 1Е10 и 2D8 на клеточной линии мышиных макрофагов J774A.1
Fig. 5. Determination of toxin-neutralizing activity of MCA 1E10 and 2D8 on mouse macrophage cell line J774A.1.

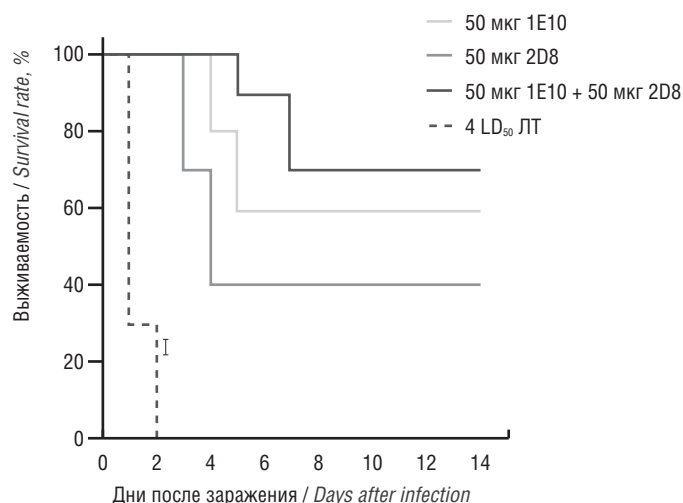


Рис. 6. Оценка протективных свойств МКА (50 мкг/мышь) после внутривенного введения ЛТ в дозе 4 LD₅₀.

Fig. 6. Evaluation of the protective properties of MCA (50 µg/mouse) after intravenous administration of LT at a dose of 4 LD₅₀.

50 мкг обеспечивает 70% выживаемость животных; при введении 100 мкг наблюдалась 100% защита. В данной работе мы изучили протективные свойства МКА 2D8, а также попытались выяснить, будет ли комбинация МКА 2D8 и МКА 1E10, направленных к разным мишеням ЛТ, нейтрализовать ЛТ более эффективно, чем каждое антитело в отдельности. Мышам внутрибрюшинно вводили МКА 2D8 как по отдельности, так и в комбинации с МКА 1E10. Спустя 24 ч внутривенно вводили ЛТ в дозе 4LD₅₀. Результаты исследований показали, что введение по отдельности МКА 2D8 и 1E10 в количестве 50 мкг/мышь обеспечивало 40% и 60% выживаемость мышей соответственно. Совместное введение двух исследуемых МКА приводило к 70% выживаемости животных (рис. 6).

Результаты исследований показали, что введение МКА 2D8 в дозе 100 мкг/мышь обеспечивает защиту в 60% случаев. Введение комбинации МКА 2D8 и 1E10 в эквивалентной дозе обеспечивает 100% выживаемость мышей (рис. 7). Таким образом, можно сделать вывод, что протективный эффект при введении комбинации исследуемых антител в данной концентрации обусловлен преимущественно действием МКА 1E10.

Обсуждение

Основным фактором патогенности бактерии *B. anthracis* является ЛТ [14]. Сибиреязвенный экзотоксин состоит из ПА с молекулярной массой 83 кДа и ЛФ с молекулярной массой 90,2 кДа [15]. Сборка ЛТ – довольно сложный и многоэтапный процесс. На первом этапе ПА с помощью IV домена связывается с рецепторами на поверхности эукариотических клеток, и сразу после этого полноразмерный ПА начинает расщепляться фурин-подобными протеазами клетки-хозяина с образованием ПА (63 кДа) [16]. Далее мономерный ПА (63 кДа) с участием III домена олигомеризуется, образуя гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами [17]. Через образовавшуюся препору ЛФ с участием I домена проходит внутрь клетки с образованием эн-

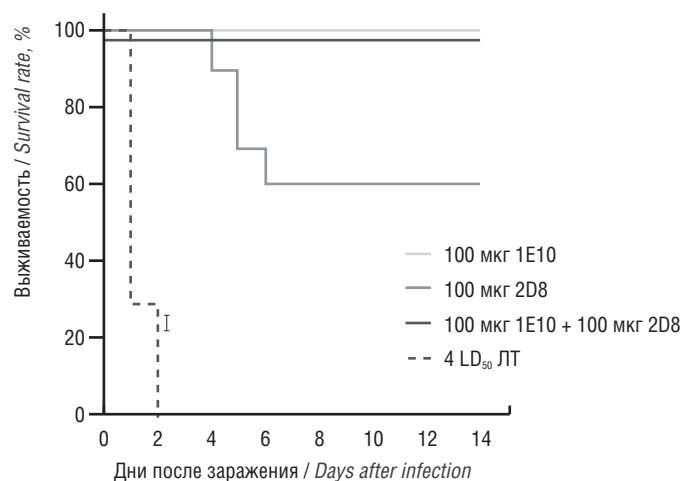


Рис. 7. Оценка протективных свойств МКА (100 мкг/мышь) после внутривенного введения ЛТ в дозе 4 LD₅₀.

Fig. 7. Evaluation of the protective properties of MCA (100 µg/mouse) after intravenous administration of LT at a dose of 4 LD₅₀.

досомы, в которой происходит сборка ЛТ [18]. Далее содержимое эндосомы постепенно закисляется, что способствует превращению препоры в истинную пору. Таким образом, токсическое действие ЛТ осуществляется только при выходе в цитозоль клетки через истинную пору. В цитозоле клетки ЛТ инактивирует митоген-активирующие белковые киназы, что приводит к гибели клетки-мишени [19].

В данной работе было охарактеризовано мышинное МКА 2D8, обладающее специфической активностью к I домену ЛФ, относящееся к классу иммуноглобулинов G, изотипу G1 и имеющее легкую цепь kappa. В экспериментах *in vitro* методом МТТ-теста с использованием клеточной линии J774 A.1 была определена его токсин-нейтрализующая активность в отношении ЛТ *B. anthracis*. Результаты МТТ-теста показали, что МКА 2D8 в концентрации 5 мкг/мл нейтрализует действие ЛТ в дозе IC₁₀₀ на 70%.

Ранее нами было получено МКА 1E10, специфичное к IV домену ПА и характеризующееся способностью нейтрализовать ЛТ в *in vitro* и *in vivo* экспериментах [11]. В данном исследовании было установлено, что МКА 2D8, специфичное к I домену ЛФ, также обладает способностью нейтрализовать ЛТ.

Несмотря на то что одного МКА, нейтрализующего действие ЛТ *B. anthracis*, может быть достаточно для обеспечения защиты, предпочтительней использовать смесь более чем одного МКА против разных компонентов токсина. Например, H.C.Staats et al. установили, что МКА 9A11, специфичное к ЛФ, обеспечивало эффективную защиту *in vivo* при введении всего лишь 0,375 мг/мышь, в то время как МКА 3F11, специфичное к ПА, не защищало в дозе 1,5 мг/мышь [23].

Кроме этого, ПА может мутировать в известных нейтрализующих эпитопах, что приводит к неэффективности терапии МКА [20]. Также антитела против ПА могут стать неэффективными в случае проникновения большого количества токсина в клетки. В связи с этим разработка антител, нацеленных на другие компоненты ЛТ, является актуальным направлением [21].

Поскольку полученные нами антитела – МКА 2D8 к 1E10 направлены к разным мишеням сибиреязвенного токсина и характеризуются высоким нейтрализующим потенциалом, мы изучили их нейтрализующую активность в отношении ЛТ в комбинации друг с другом в *in vitro* и *in vivo* экспериментах.

Результаты наших исследований на макрофагах показали, что минимальная концентрация МКА 1E10 и 2D8, необходимая для нейтрализации 98% ЛТ, составила 0,3 мкг/мл для каждого антитела. В исследовании N.Mohamed et al. было получено МКА 14B7, специфичное к ПА, которое в экспериментах *in vitro* нейтрализовало ЛТ в дозе IC100 при концентрации 3 мкг/мл [22]. Таким образом, для нейтрализации ЛТ требуется концентрация полученных нами антител на порядок ниже в сравнении с МКА 14B7 в вышеописанном исследовании.

Далее на мышинной модели мы провели оценку токсин-нейтрализующей активности двух МКА по отдельности, а также в комбинации друг с другом с целью выявления способности комбинации двух антител против ПА и ЛФ усиливать нейтрализующую активность в отношении ЛТ.

Добавление МКА 2D8 к 1E10 продемонстрировало усиление нейтрализующей активности в отношении ЛТ в тестах *in vitro*. Эксперименты на мышах показали, что совместное введение МКА 1E10 и 2D8 в количестве 50 мкг/мышь приводило к синергетическому эффекту нейтрализации ЛТ. Выживаемость животных увеличивалась на 10% по сравнению с выживаемостью мышей при введении МКА 1E10 отдельно. Несмотря на незначительный синергичный эффект, использование двух антител для профилактики и терапии сибиреязвенной токсикоинфекции может быть необходимым, если учитывать возможность проникновения мутантного варианта ПА, который не будет взаимодействовать с МКА 1E10.

Увеличение концентрации МКА, вводимого в организм, до 100 мкг/мышь затруднило проведение оценки их синергичного эффекта на нейтрализацию ЛТ в связи со 100% выживаемостью мышей при введении одного МКА 1E10.

Вероятно, на способность комбинации антител обеспечивать аддитивную/синергетическую защитную активность могли повлиять многие факторы, включая плотность экспрессии антигена, специфичность эпитопа, связывающую аффинность МКА и изотип антитела.

Таким образом, МКА 2D8, нейтрализующее проявление ферментативной активности ЛФ, может быть использовано совместно с МКА 1E10 в качестве потенциального терапевтического препарата с расширенным спектром нейтрализующей активности.

Заключение

В данной работе экспериментально обоснована возможность использования комбинации МКА 1E10 и 2D8 в качестве потенциального терапевтического препарата, дополняющего лечение антибиотиками для купирования токсин-зависимых симптомов сибирской язвы. Для снижения реактогенности препарата мышинные МКА 1E10 и 2D8 планируется химеризовать и гуманизировать.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке отраслевой научной программы Роспотребнадзора.

Funding source

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. 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. *Nat Microbiol*. 2019 Aug;4(8):1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
2. Шишкова НА, Тюрин ЕА, Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Современное состояние проблемы сибирской язвы. *Бактериология*. 2017;2(3):33-40. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-33-40
3. Рязанова АГ, Скударева ОН, Герасименко ДК, Логвин ФВ, Аксенова ЛЮ, Семенова ОВ, и др. Анализ ситуации по сибирской язве в 2022 г. в мире, прогноз на 2023 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(2):88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94
4. Информация о состоянии здоровья заразившихся сибирской язвой – БУ «Республиканская клиническая офтальмологическая больница» Минздрава Чувашии [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://rkob.med.cap.ru/press/2023/3/22/informaciya-o-sostoyanii-zdorovjya-zarazivshihsyayscid=m73b3gzhp89605491> (дата обращения: 10.09.2024).
5. Zhou B, Carney C, Janda KD. Selection and characterization of human antibodies neutralizing *Bacillus anthracis* toxin. *Bioorg Med Chem*. 2008 Feb 15;16(4):1903-13. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.11.001
6. Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Feb;7(1):19-24. DOI: 10.1016/j.mib.2003.12.001
7. Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs*. 2009 Nov-Dec;1(6):531-8. DOI: 10.4161/mabs.1.6.10195
8. Chen Z, Moayeri M, Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins (Basel)*. 2011 Aug;3(8):1004-19. DOI: 10.3390/toxins3081004
9. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019 Dec;7(6):e00535. DOI: 10.1002/prp2.535
10. Белова ЕВ, Колесников АВ, Захарова МЮ, Дубилей СА, Дятлов ИА, Шемякин ИГ. Особенности иммунного ответа на летальный токсин *Bacillus anthracis*. *Биоорганическая химия*. 2008;34(5):639-644.
11. Романенко ЯО, Марьин МА, Рябко АК, Карцева АС, Силкина МВ, Зенинская НА, и др. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител против летального токсина *Bacillus anthracis*. *Иммунология*. 2021;42(3):232-242. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242
12. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):17902-13. DOI: 10.1074/jbc.M807510200
13. Силкина МВ, Карцева АС, Рябко АК, Марьин МА, Романенко ЯО, Калмантаева ОВ, и др. Оптимизация условий электрослияния для получения гибридом, синтезирующих человеческие моноклональные антитела. *Биотехнология*. 2021;37(2):77-87.
14. Brachman PS. Inhalation anthrax. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;353:83-93. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb18910.x
15. Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:243-65. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728

16. Lacy DB, Wigelsworth DJ, Melnyk RA, Harrison SC, Collier RJ. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13147-51. DOI: 10.1073/pnas.0405405101
17. Kintzer AF, Thoren KL, Sterling HJ, Dong KC, Feld GK, Tang II, et al. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol*. 2009 Sep 25;392(3):614-29. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037
18. Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, Schuck P, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3902-8. DOI: 10.1128/IAI.00200-09
19. Wickner W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1452-6. DOI: 10.1126/science.1113752
20. Yamamoto BJ, Shadiack AM, Carpenter S, Sanford D, Henning LN, O'Connor E, et al. Efficacy Projection of Obiltoximab for Treatment of Inhalational Anthrax across a Range of Disease Severity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):5787-95. DOI: 10.1128/AAC.00972-16
21. Zhang D, Liu W, Wen Z, Li B, Liu S, Li J, et al. Establishment of a New Zealand White Rabbit Model for Lethal Toxin (LT) Challenge and Efficacy of Monoclonal Antibody 5E11 in the LT-Challenged Rabbit Model. *Toxins (Basel)*. 2018 Jul 12;10(7):289. DOI: 10.3390/toxins10070289
22. Mohamed N, Li J, Ferreira CS, Little SF, Friedlander AM, Spitalny GL, et al. Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3276-83. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3276-3283.2004
23. Staats HF, Alam SM, Searce RM, Kirwan SM, Zhang JX, Gwinn WM, et al. In vitro and *in vivo* characterization of anthrax anti-protective antigen and anti-lethal factor monoclonal antibodies after passive transfer in a mouse lethal toxin challenge model to define correlates of immunity. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5443-52. DOI: 10.1128/IAI.00529-07
9. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019 Dec;7(6):e00535. DOI: 10.1002/prp2.535
10. Belova EV, Kolesnikov AV, Zakharova MYu. Dubiley SA, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Special Features of Immune Response to the Lethal Toxin of *Bacillus anthracis*. *Bioorganic Chemistry*. 2008; 34(5):639-644. (In Russian).
11. Romanenko YaO, Marin MA, Riabko AK, Kartseva AS, Silkina MV, Zeninskaya NA, et al. Toxin neutralizing activity of monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Immunologiya*. 2021;42(3):232-42. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242 (In Russian).
12. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):17902-13. DOI: 10.1074/jbc.M807510200
13. Silkina MV, Kartseva AS, Ryabko AK, Marin MA, Romanenko YaO, Kalmantaeva OV, et al. Optimization of electrofusion conditions for obtaining hybridomas synthesizing human monoclonal antibodies. *Biotechnologiya*. 2021;37(2):77-87. (In Russian).
14. Brachman PS. Inhalation anthrax. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;353:83-93. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb18910.x
15. Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:243-65. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728
16. Lacy DB, Wigelsworth DJ, Melnyk RA, Harrison SC, Collier RJ. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13147-51. DOI: 10.1073/pnas.0405405101
17. Kintzer AF, Thoren KL, Sterling HJ, Dong KC, Feld GK, Tang II, et al. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol*. 2009 Sep 25;392(3):614-29. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037
18. Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, Schuck P, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3902-8. DOI: 10.1128/IAI.00200-09
19. Wickner W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1452-6. DOI: 10.1126/science.1113752
20. Yamamoto BJ, Shadiack AM, Carpenter S, Sanford D, Henning LN, O'Connor E, et al. Efficacy Projection of Obiltoximab for Treatment of Inhalational Anthrax across a Range of Disease Severity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):5787-95. DOI: 10.1128/AAC.00972-16
21. Zhang D, Liu W, Wen Z, Li B, Liu S, Li J, et al. Establishment of a New Zealand White Rabbit Model for Lethal Toxin (LT) Challenge and Efficacy of Monoclonal Antibody 5E11 in the LT-Challenged Rabbit Model. *Toxins (Basel)*. 2018 Jul 12;10(7):289. DOI: 10.3390/toxins10070289
22. Mohamed N, Li J, Ferreira CS, Little SF, Friedlander AM, Spitalny GL, et al. Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3276-83. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3276-3283.2004
23. Staats HF, Alam SM, Searce RM, Kirwan SM, Zhang JX, Gwinn WM, et al. In vitro and *in vivo* characterization of anthrax anti-protective antigen and anti-lethal factor monoclonal antibodies after passive transfer in a mouse lethal toxin challenge model to define correlates of immunity. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5443-52. DOI: 10.1128/IAI.00529-07

References

Информация о соавторах:

Романенко Яна Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Карцева Алена Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Силкина Марина Владимировна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-5329-2807

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Рогозин Метхун Мадисович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-8021-8453

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0052-2602

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1959-1739

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9898-9894

Information about co-authors:

Yana O. Romanenko, Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Alena S. Kartseva, PhD in Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Marina V. Silkina, Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0002-5329-2807

Maxim A. Marin, Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0001-8021-8453

Anna E. Khylyntseva, PhD in Biological Sciences, Researcher Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0052-2602

Tatiana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Research Associate, Laboratory of Biological Testing, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1959-1739

Victoria V. Firstova, PhD, DSc in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9898-9894

НОВОСТИ НАУКИ

Открытие фермента дает новую надежду на стратегии лечения болезни Лайма

Зоонозный патоген, возбудитель болезни Лайма *Borrelia burgdorferi* выработала уникальные метаболические пути, некоторые из которых являются специфическими и необходимыми для ее выживания и, таким образом, представляют собой идеальные цели для разработки новых терапевтических средств. *B. burgdorferi* обходится без тиамина в качестве кофактора и полагается на лактатдегидрогеназу (BbLDH) для преобразования пирувата в лактат для балансировки соотношений NADH/NAD⁺. Было показано, что BbLDH является канонической лактатдегидрогеназой с некоторыми уникальными биохимическими и структурными особенностями. Исследование потери функции показывает, что BbLDH необходим для выживания и инфекционности *B. burgdorferi*, подчеркивая его терапевтический потенциал. Скрининг лекарственных средств выявляет четыре ранее неизвестных ингибитора лактатдегидрогеназы с минимальной цитотоксичностью, два из которых подавляют рост *B. burgdorferi*. Это исследование дает механистическое представление о функции BbLDH в патофизиологии *B. burgdorferi* и закладывает основу для разработки специфичных для данного рода метаболических ингибиторов против *B. burgdorferi* и, возможно, других патогенов, переносимых клещами.



Sze CW, Lynch MJ, Zhang K, Neau DB, Ealick SE, Crane BR, et al.
Lactate dehydrogenase is the Achilles' heel of Lyme disease bacterium Borrelia burgdorferi.
mBio. 2025 Mar 20:e0372824. DOI: 10.1128/mbio.03728-24

Определение серотипа *Pseudomonas aeruginosa* на основе данных полногеномного секвенирования

А.А.Ковалевич, Р.В.Писанов, А.С.Водопьянов

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

Определение серотипа (типа О-антигена) – один из способов типирования патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Серотипирование клинических изолятов дает важную информацию при эпидемиологическом расследовании случаев заболевания, особенно при возникновении вспышек и(или) внутрибольничном инфицировании. Вместе с тем применение сывороток не позволяет проводить разделение некоторых серогрупп из-за иммунологического перекреста. Развитие полногеномного секвенирования открывает новые перспективы для установления серотипов, но уже с использованием молекулярно-генетических методов.

Целью исследования был анализ ЛПС-кластера у разных серотипов *P. aeruginosa* и разработка методики определения серотипа на основе данных полногеномного секвенирования.

В работе были использованы нуклеотидные последовательности эталонных О-антигенов *P. aeruginosa*, полученные из международной базы NCBI. По итогам анализа нуклеотидных последовательностей были найдены *wzx* гены для каждой серогруппы. Для валидации использовали 345 геномов из базы NCBI с подтвержденными данными о серогруппе агглютинирующими О-сыворотками. Найдены три новых *wzx* гена О-кластеров *P. aeruginosa*. По итогам проведенного исследования О-кластеров нами было выявлено 13 аллельных вариантов гена *wzx* среди известных 20 серотипов согласно международной системе антигенного типирования. Полученные данные позволили дополнить ранее созданную программу *Pseudomonas Analyser* возможностью проводить анализ серогруппы только по различию в нуклеотидном строении последовательностей гена *wzx* с использованием данных полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, серогруппа, серотипирование, полногеномное секвенирование, синегнойная палочка, *Pseudomonas Analyser*

Для цитирования: Ковалевич А.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. Определение серотипа *Pseudomonas aeruginosa* на основе данных полногеномного секвенирования. Бактериология. 2025; 10(1): 17–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-17-25

Determination of *Pseudomonas aeruginosa* serotype based on whole-genome sequencing data

A.A.Kovalevich, R.V.Pisanov, A.S.Vodopyanov

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

Determination of the serotype (type of O-antigen) is one of the ways of typing pathogenic and opportunistic microorganisms. Serotyping of clinical isolates provides important information in the epidemiological investigation of cases of the disease, especially in the event of outbreaks and/or nosocomial infection. At the same time, the use of sera does not allow for the separation of some serogroups due to the immunological overlap. The development of genome-wide sequencing opens up new prospects for establishing serotypes, but using molecular genetic methods.

The aim of the study was to analyze the LPS cluster in different serotypes of *P. aeruginosa* and develop a methodology for determining the serotype based on genome-wide sequencing data. The nucleotide sequences of reference O-antigens of *P. aeruginosa* obtained from the international NCBI database were used in the work. Based on the analysis of nucleotide sequences, *wzx* genes were found for each serogroup. 345 genomes from the NCBI database with confirmed data on serogroup agglutinating O-serum were used for validation. 3 new *wzx* genes of *P. aeruginosa* O clusters were found. Based on the results of the O-cluster study, we identified 13 allelic variants of the *wzx* gene among the known 20 serotypes according to the international antigenic typing system. The data obtained made it possible to supplement the previously created «*Pseudomonas Analyser*» program with the ability to analyze the serogroup only by differences in the nucleotide structure of the *wzx* gene sequences using whole-genome sequencing data.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, serogroup, serotyping, whole-genome sequencing, *Pseudomonas Analyser*

For citation: Kovalevich A.A., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S. Determination of *Pseudomonas aeruginosa* serotype based on whole-genome sequencing data. Bacteriology. 2025; 10(1): 17–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-17-25

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) 240-9133
E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru
ORCID: 0000-0001-6926-0239

Статья поступила 19.07.2024, принята к печати 31.03.2025

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
ORCID: 0000-0001-6926-0239

The article was received 19.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательный аэробный условно-патогенный микроорганизм, с которым ассоциировано почти 10% случаев всех внутрибольничных инфекций [1]. Это связано с различными факторами, такими как широкий арсенал факторов патогенности и разнообразие метаболических путей [2]. *P. aeruginosa* также обладает поразительной способностью развивать устойчивость практически ко всем доступным противомикробным препаратам путем либо адаптивных мутаций, либо приобретения мобильных генетических элементов [3].

Одним из основных факторов вирулентности *P. aeruginosa* является липополисахарид (ЛПС), который напрямую взаимодействует с внеклеточной средой [4]. ЛПС является неотъемлемым компонентом оболочки грамотрицательных клеток и состоит из трех доменов: липида А, основного полисахарида, и О-антигена, который, в свою очередь, играет важную роль как в адгезии клеток, так и в защите от фагоцитоза клетками иммунной системы макроорганизма [5–7]. Среди типизируемых изолятов *P. aeruginosa* серотипы О1 и О11 в основном ассоциированы с острыми инфекционными заболеваниями, в то время как изоляты серотипа О4 ассоциированы со случаями летального исхода пациентов. Серотип О6 – наиболее часто типизируемый среди остальных серотипов [8].

Известно, что О-антиген состоит из двух компонентов: общего полисахаридного антигена (CPA или А-группа) – гомополимера, имеющего консервативную структуру и состоящего из повторяющихся звеньев трисахарида d-рамнозы, и О-специфического антигена (OSA или В-группа) – гетерополимера, среди которых выделяют 20 серотипов согласно схеме, предложенной международной системой антигенного типирования (IATS) [9].

Именно на вариабельности OSA основана существующая система серотипирования возбудителя синегнойной инфекции, используемая для установления взаимосвязи между серотипами О-антигена и эпидемической значимостью возбудителя [10]. Помимо этого, О-антигены служат мишенями для разработки противомикробных препаратов, таких как бактериофаги, бактериоцины, например R-, S- и L-пиоцины; и опсонизирующие антитела.

Следовательно, серотипирование клинических изолятов *P. aeruginosa* дает важную информацию при эпидемиологическом расследовании случаев заболевания, особенно при возникновении вспышек и(или) внутрибольничном инфицировании. В свою очередь, в соответствии с действующими нормативными документами для типирования и идентификации возбудителей внебольничных пневмоний, коим является *P. aeruginosa*, могут применяться лабораторные методики, разработанные научно-методическими и референс-центрами, а также проведение секвенирования с целью определения нуклеотидного состава [11].

Вместе с тем известно, что при хроническом течении инфекции ряд штаммов *P. aeruginosa* не серотипируется, что может быть обусловлено модификациями ЛПС вследствие длительного контакта бактерии с клетками макроорганизма, при противодействии клеткам иммунной системы и бактериофагам во внешней среде [12–14]. Исследование, проведенное J.P.Pirnay et al. [15], показало, что 65% всех исследованных изолятов *P. aeruginosa* были либо нетипиру-

емыми, либо мультитипируемыми сыворотками, и поэтому присвоение определенного серотипа этим штаммам затруднено. Несмотря на это, серотипирование продолжает оставаться актуальным, широко используемым методом для типирования штаммов *P. aeruginosa*, и развитие полногеномного секвенирования открывает новые перспективы для установления серотипов, но уже с использованием молекулярно-генетических методов, лишенных недостатков при использовании сывороток, дающих перекресты с некоторыми серогруппами.

Стоит отметить и то, что среди 25 000 геномов *P. aeruginosa* в международной базе NCBI всего у 345 существует информация об их серогруппе (на момент исследования), что свидетельствует о недостаточной разработке этой проблемы.

Кроме того, одной из задач, поставленной перед центрами секвенирования является создание вычислительных алгоритмов и программных средств, позволяющих проводить экспресс-генотипирование возбудителей инфекционных заболеваний [16].

В связи с этим цель исследования состояла в анализе вариабельности ЛПС-кластера у разных серотипов *P. aeruginosa* и разработке методики определения серотипа на основе данных полногеномного секвенирования.

Материалы и методы

В работе были использованы нуклеотидные последовательности О-антигенов *P. aeruginosa*, полученные из международной базы NCBI на основе работы C.K.Raymond et al. (2002) [17]. Для построения и отображения дендрограммы использовали программу pyGenomeViz v.0.2.1 и FigTree v 1.4.3 [<https://github.com/moshi4/pyGenomeViz>, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]. Поиск открытых рамок считывания проводили с помощью программы Glimmer3 [18]. Анализ данных полногеномного секвенирования проводили с помощью пакета программ BLAST (blastn, blastp, rps-blast) и авторской программы (<http://antiplague.ru/pseudomonas-analyser/>) [19]. Собственное программное обеспечение разрабатывали на языке программирования Java. В качестве референс-штаммов были использованы PAO1 [20], PA14 [21]. В качестве референса была использована программа для определения серотипа *P. aeruginosa* по данным полногеномного секвенирования PAST [22].

Для валидации разработанного алгоритма были использованы 345 полных геномов штаммов *P. aeruginosa*, полученных из международной базы NCBI с подтвержденными данными о серогруппе.

Результаты исследования и их обсуждение

Из международной базы NCBI были получены полногеномные последовательности 20 кластеров О-антигенов *P. aeruginosa*, описанные в работе C.K.Raymond et al. (2002) [17].

С целью унификации обозначения генов были проведены поиск открытых рамок считывания и их аннотация, что позволило составить реестр генов О кластеров *P. aeruginosa*, на основании чего была построена дендрограмма, отражаю-

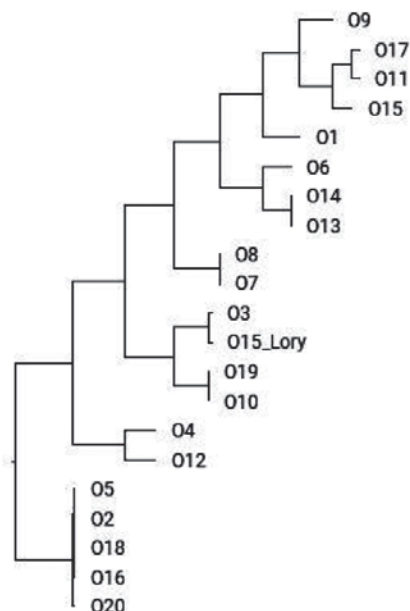


Рис. 1. Дендрограмма, отображающая близость генетического строения О-антигенов *P. aeruginosa*.

Fig. 1. Dendrogram showing the proximity of the genetic structure of O-antigens of *P. aeruginosa*.

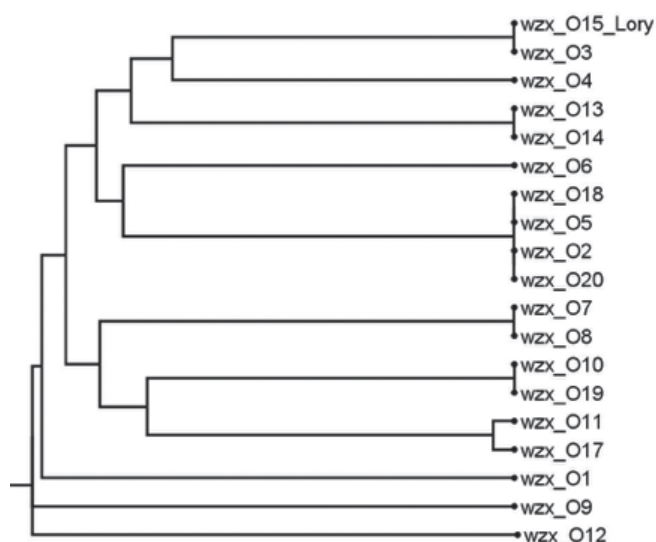


Рис. 2. Дендрограмма, отображающая гомологию строения гена *wzx* О-кластеров *P. aeruginosa*.

Fig. 2. Dendrogram showing the homology of the *wzx* gene structure of O-clusters of *P. aeruginosa*.

щая степень генетической близости 20 кластеров О-антигена, взятых из международной базы NCBI (рис. 1). В результате было обнаружено, что часть серогрупп очень близки по своему генетическому составу. Таким образом, их можно было разделить на 7 групп: 1 – О2, О5, О16, О18, О20, 2 – О4, О12, 3 – О10, О19, 4 – О3, О15-Lory, 5 – О7, О8, 6 – О13, О14, 7 – О11, О17. Поэтому следующей задачей стало повышение дискриминирующей способности и разделение этих групп на максимально возможное число серогрупп, основанное на вариабельности строения гена *wzx* *P. aeruginosa*.

Ген *wzx* является одним из важнейших элементов формирования О-антигенной структуры *P. aeruginosa* [23]. Кроме этого, способ идентификации и дифференциации О-антигенов, основанный на строении гена *wzx*, применен на широко

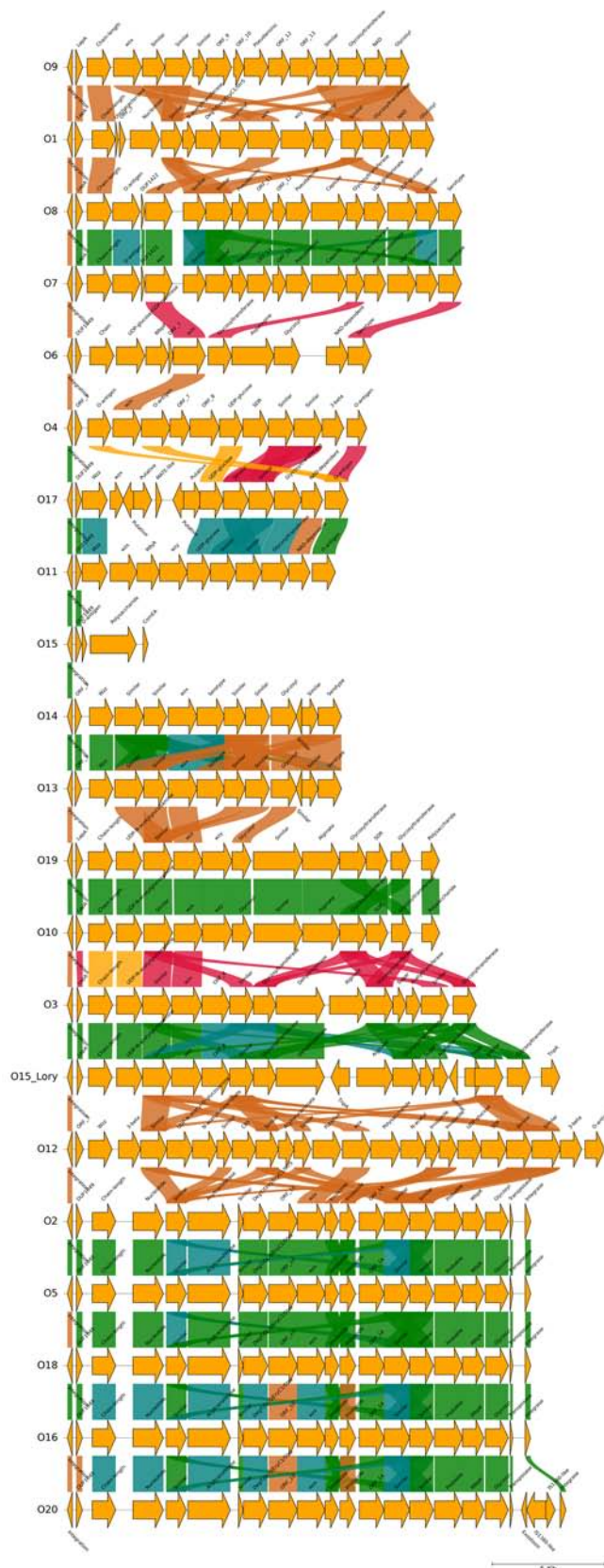


Рис. 3. О-антигенная структура серогрупп *P. aeruginosa*. Области, отмеченные зеленым цветом, совпадают на 100% по аминокислотной последовательности, зеленовато-голубым – на 99%, коричневым – на 95%, оранжевым – на 90%, бордовым и красным – на 30%.

Fig. 3. O-antigen structure of *P. aeruginosa* serogroups. The areas marked in green have 100% amino acid sequence identity, greenish-blue 99%, brown 95%, orange 90%, maroon and red 30%.

Таблица. Нуклеотидные последовательности гена *wzx* О-кластеров *P. aeruginosa*
Table. Nucleotide sequences of the *wzx* gene of O-clusters of *P. aeruginosa*

O1	ATGTTTCTCGGAAGATAGCGGTTTTGCTATAGGCTCTATCGGGTGGGCTGTTCTGGTCTGATAACGCTCCCTATAATTACTTGGTTTTATCCGCTGAAGA TGTTGGCCGATTGCAATGCTCAAGTTGCCTCAAACTTCTGTGTTCTCTTTTTGCTAGGGTTGGATCAAGCCTATGTGCGTGAATATCACGAAGAAAA AATCGCTCGGCATTATTGAAATCTTGCTTTTTCCCGGGTTGTTTTGCTTTTTGCTTTGCTTTTTGTTTTTATGATGCATCGATATTTCTGATTTTAT GTACGAGAAAAAGCGATGGTCTACTTGCCTATCTGACAATGCTTTGTTTTGTTTTGCAATTGGTTCTCGCTTCTCTCCCTGATTCTGAGAATGCAGGAAAGAG CTCTTTCGCTTCTTTGACTCAGATATCGCCTAAATCTTTTTGATCGTCAATGCTGCTTTTTGTTTTTCCATACCGCGCTTTTGTGAAGTTTATTAGT GGCGCAAGCAATATCTATGTTTACGATCATGTCTATTTTGTGGAATACCGTGGTGAATGGAGACCATGGAATGCCTATACGTTGTACAAGACACAGTTTC ATGAGTTGTTGCGTTTCGGTCTACCATAGTTGTGGGCGGAGTGGCGGCATGGGACTGTATGTCATGGATAGACTCTTTTGCCTGCGCTTCTACCTTTTC AGAGTTGGGATATTCAGTAGCGGTGAGTATCGCAGCAGGTGCTGGTATCTTGGAAACATTTTACGACCATATGGTCTCCAACGGCTCTCAAATGGGCT GCCGAGGGGTTGATGAAAAAGAAATGATGAAATATCGGAGCATGTACTGGCGTGCCTTTCTATATATTTAATAAGTGGGCTGTTCTCTTGGATGGTTCC ACTTTTTTACCTGAAGCATATCGCCCATACAGTACATGATAACAGTATGTGTGGCTCTCCCTACTTTATGCTCTCTCAGAGGCAACGGCGATCGGCATCA GCATTTCTCGCCGAACCGGCTTTCTATGCTGTCTCTATTTAGCTGCGTTAACTAGCTTCGGTGGTAATATCTGTTGGTTCTCTCTATGGAGCAGCTGGT GCAGCGGTAGCTACTGCTGTTGCGTTTTGGGTTTTCTATTCTCGGAACTGAGTTTCTGGTTCGGTGTGGCGTAAGATACCTAGGCTTAAGCTTTATATGG TTACCTTTTCTGCACTTTGACAAGCTATTGATTCTGCTCGGAAACAAAAAATCAGGCTCTATCTTGGTTTTCTGGGCATTACTTGGATTGAAAGGAGCT TTCTTTTCCGAAATCTATTGGGCTTCTCTTTCGGTGTCTATTCTCACTATAGGAAAGAAAAACATGTTGA
O6	ATGCTGGGAAACATAGTCTGGTTATTTTTGTTCAAGTCTTTCCGGCAATATTGACTCTTGTGCGTCTTTCCGTTTTACTCGTCTGTTGAGTCCGGGTGA GTATGGAGTCTATTTCGCTGACAATTATAGTTGTTGGCTTCTCAATACGGTTTTCTGCAATGGGTGGCGCTGGGGGTTGGTCTGTTATCGCTGAGTGTAGT GATGACCAAGCTCGGGCGAGGCTTCTTGGCAGCGCTAGGGCCATTAGCTTCTTCTTCACTCGTTATCATATTCTGTCACGTTCTCTGTTGGGAGTGGCGT GAAGAGATAGTTTCTCTTCTTATATATGTTGTCGGTTTTCTTGGCTGCGCAGCGCTGGGCGATTTGAATCTGAAGATTCAAATGCGATCTTGCAGCC GCTGACCTACGGGAAATGTTGTTGATCAAGGGGCTGGAAGCTTCTTATCGGTGTTCTCTTGTATTTCGGGTTTGGCGTTGATGGTTTGTCTGCTGGG TACGCTTGTGCTCTGTTACTGGCGACCATTTTCTTCAAGATGCGTGGCGGGAGTCACTTGGCGGTGGTAGACAAGGAGCAGTTAACCAGGTTGTTTG CCTATGGTGACCACTGACGCTTACTTTCTTTTTGCATTCATAGTCAATGCTGCTGATCGCTTCTTATTGGGCGATTTTGGGGGATGCCGCGTAGGTGT CTACTCGGTGTCGCGCGGCTTCTCTGTTGATGAGTGGTTCGTGCTGCTACCTGGCGGCTTTCCGCTGGTGAATGGAAGAACTTCCAAGAGC GGCTTGCCACAGACAGGACCAACTGCGGAAGACCTTTATTTTATCTTTCAGTAGTCTCGCCTGCTGCTGTGGTCTGGCCATGGTGGCTCCGGAAT TCAGGATCTATTATGGCGAAGAGTTTCGTGAGGGTGCCTAAAGATAATTCCGTTGATATCCCTTTCCGGCTTTCTGGGGGCTTGAATCTTTTACTTTGA CTACTCTTTCAATTGGCTAGTGTACACGAGTGCAGGTTGTGACAGTGGCGGTGTGCGCAGTGGTTGATGTTGTTTTAATTAATCCTTATCCGAGTTT GGGATGTTGTCGCGCGGCTTCTCTGTTATGGCGTTTTCTGCTGCAATATTAGTATCTTCTTGGGCGCAGCTTCTTGGGCGCCGCTTCCG GGGAAAGATGCTATGAAATGCGTTGTCTGTGCTGTTGATGGCGGTGTCAGTTGCATCCTTCAGTTTGAGAGTGTCTTTTTTGGTCTGTTGTGAAAGTTG TCTTGGGGGAGGGGCTATTGGCGCAATGATTGCTCTTGATGATCTGGCATGCGTACTTCTGAAGAGCAAGCTAATTCGATGA
O2, O5, O18, O20	ATGAGTGGCGCTTTTATCAACCGTGTGCGACGAGTATTAGTAGGCACCTTGGGAGCACAGCTCATAACGATTGGTGTCACTCTGCTACTGGTTCGTCTGTAT TCTCCTGCTGAAATGGGCGCTTTCAGTGTTTGGCTATCGTTTCGCTACGATTTTTCAGTTGTAAGTACTGGGCGCTATGAGTTGGCTATTTTTCGACTCGA GAAGAGGGCGAACTACAGGCAATCGTCAAGCTGATACCTCAGTGCATATTGCTTTCGTTGCCGTGGCGATTGCTGTTGTTATAGGTAGACATCTGATT GAGTCGATGCCAGTTGTGATCGCGCAATACTGGTTCCGATTCGCGGTGGCTTCTGCTGGGTTGGGGATAAATAAGCTAGCTTGTGCTGTTACTTACATTCA ACAATCTTTAATCGGTTGGGAGTTGCTCGTGAAGCCTGGCTGCATGATTGCCGTTGCACAAGTTTCAGCTGCATATTACTGGAGGGCGTATCAGGGCT GATCTATGGCCAGCTGTTTGGTGTGCTCGTAGCCACGGCGCTTGGCGCCCTTTGGGTAGGAAAGTCGCTGATTTAAATTTGATCGAGACACCGTGGCGT ATGTCACGACAAGTAGCGGTACAGTACATCAATTTCCGGAAGTTTCTCTGCTCGGATCTGGTCAACACGTTGCCAGTCAGGTCCGCTGATTATTATG CGCGCAAGTTTGGTGGAGACAGTGCAGGCTGGTTGGCTGACTCTGAAGATAAGGAGCTCCCATTTCTTGTGGCTGCTCGGCTGCTCGATGTGT TCAAAGAACAAGCCGCTCGTACTACCGAGAGTTTGGTAATTGCCGAGGTATCTTCTCAAGACTTTCAGGTTGCTTGGCGTCTCGCGCTACCTCCTTTT ATTATATTTTGGTTCATTGGCGAGTGGGCTTTGGGTTAGTCTTTGGCGAAGCGTGGGCTGAGTCCGGGCGTTATGCTGTATTGATGGTTCCGTTGTTTAT ATGCGTTTCTGGTGAGTCCGCTCAGCTATACAATCTATATGCCAGCGGAGATGAGATTGTTGTGGCAGCTAGCCTTGTGCTCTGACGTTTCTGACGTTTAT TGTTTTACCTTGCCTGACTCTGTGCACTCGGTGTTGTGGTTTTACTCCTAGCATAGTGTGTTATGATTTTGTCTATTCTGGATGTCTTCCAGTGTGCCAA GGGAGATGCCAAGTGA
O16	ATGAGTGGCGCTTTTATCAACCGTGTGCGACGGGTATTAGTAGGCACCTTGGGAGCACAGCTCATAACGATTGGTGTCACTCTGCTACTGGTTCGTCTGTAT TCTCCTGCTGAAATGGGCGCTTTCAGTGTTTGGCTATCGTTTCGCTACGATTTTTCAGTTGTAATTAAGTGGGCGCTATGAGTTGGCTATTTTTCGACTCGA GAAGAGGGCGAACTCCAGGCAATCGTCAAGCTGATACCTCAGTGCATGTTGATTTCGTTGCCGTGGCGATTGCTGTTGTTATAGGTAGACATCTGATT GAGTCGATGCCAGTTGTGATCGCGCAATACTGGTTCCGATTCGCGGTGGCTTCTGCTGGGTTGGGGATAAATAAGCTAGCTTGTGCTGTTACTTACATTCA ACAATCTTTAATCGGTTGGGAGTTGCTCGTGAAGCCTGGCTGCATGATTGCCGTTGCACAAGTTTCAGCTGCATATTACTGGAGGGCGTATCAGGGCT GATCTATGGCCAGCTGTTTGGTGTGCTCGTAGCCACGGCGCTTGGCGCCCTTTGGGTAGGAAAGTCGCTGATTTAAATTTGATCGAGACACCGTGGCGT ATAGTACGACAAGTAGCGGTACAGTACATCAATTTCCGGAAGTTTCTCTGCTCGGATCTGGTCAACACGTTGCCAGTCAGGTCCGCTGATTTATTG CGCGCAAGTTTGGTGGAGACAGTGCAGGCTGGTTGGCTGACTCTGAAGATAAGGAGCTCCCATTTCTTGTGGCTGCTCGGCTGCTCGATGTGT TCAAAGAACAAGCCGCTCGTACTACCGAGAGTTTGGTAATTGCCGAGGTATCTTCTCAAGACTTTCAGGTTGCTTGGCGTCTCGCGCTACCTCCTTTT ATTATATTTTGGTTCGTTGGCGAGTGGGCTTTGGGTTAGTCTTTGGCGAAGCGTGGGCTGAGTCCGGGCGTTATGCTGTATTGATGGTTCCGTTGTTTAT TATGCGTTTCTGGTGAGTCCGCTCAGCTATACAATCTATATGCCAGCGGAGATGAGATTGTTGTGGCAGCTAGCCTTGTGCTCTGACGTTTAT TGTTTTACCTTGCCTGACTCTGTGCACTCGGTGTTGTGGTTTTACTCCTAGCATAGTGTGTTATGATTTTGTCTATTCTGGATGTCTTCCAGTGTGCCAA AGGAGATGCCAAGTGA
O17	ATGGGCAGCAACTATCTTTTGCCTCTTGTGCGATTCTTTTCTCACGAGAACATTGTCAAGCGAAGCGTTTGGCCAATTGGTGATTGCCAGGCCGTGGCT GTCATTCTATGTCAACTGGTAGACTTTGGATTATTCTGGCAGGATCAAGAAAGGCTGCCATTATCGATAACAAAGTTGAAGTGTCTAGTTCTTTTCTGTTGTA CAGAGTGCTAGATTCTTATTGTTGCTGCTTCACTTTTGTGCTGGCCATTTTGGCTGATCTCTTATTTACCAATCCCTTGCCTGATTGTTGGTGGCGCTGCT CTTCCGGCAGTAGTTGGAATATCTTCAAGCAGTATGGTTCTTTCAGGGAAGAGCGCTTTTGGATGGTTGGCGCTTACCAATTTTTGTCTAAGGATTTTAT TTTCCATTGCTGTTTTTTTGTACGAAAGATTCTGACCTTGTGCTGGCTTCTGTTGGGTTTGGTTTTTCTATGTCATAGGTGGAAGTGTCTCTGTTGTA TTTTATTTCTATGGGGCGGTTGCGAAGTGAAGTCAACACGGTTACTGGATTGAGGCAGGAGCCTCATGATACGTAG
O11	ATGGGCAGCAACTATCTTTTGCCTCTTGTGCGATTCTTTTCTCACTAGAACATTGTCAAGCGAAGCGTTTGGCCAATTGGTGATTGCCAGGCCGTGGCT GTCATTCTATGTCAACTGGTAGACTTTGGATTATTCTGGCAGGATCAAGAAAGGCTGCCATTATCGATAACAAAGTTGAAGTGTCTAGTTCTTTTCTGTTGTA CAGAGTGCTAGATTCTTATTGTTGCTGCTTCACTTTTGTGCTGGCCATTTTGGCTGATCTCTTATTTACCAATCCCTTGCCTGATTGTTGGTGGCGCTGCT CTTCCGGCAGTAGTTGGAATATCTTCAAGCAGTATGGTTCTTTCAGGGAAGAGCGCTTTTGGATGGTTGGCGCTTACCAATTTTTGTCTAAGGATTTTAT TTTTCTATTGCTGTTTTTTTGTACGAAAGATTCTGACCTTGTGCTGGCTTCTGTTGGGTTTGGTTTTTCTATGTCATAGGTGGAAGTGTCTCTGTTGT ATTTCTATTGTCGTTTTTTTGTACGAAAGATTCTGACCTTGTACTGGCTTCTGTTGGGTTTGGTTTTTCTATGTCATAGGTGGAAGTGTCTCTGTTGT ATTTTATTTCTATGGGAATACGGTGGCGCCCGGTTCTCGAGAAAGACAGAAATCTCGATATATTGCGTGACGGTGTCTGATCTTTCTTCTGCTGCTTTCT TAGCTTGCACATGAAGTGTCTGTTGGCGCGGTTGGTGTGTTGGTGGAACTCCGCGGCCGAGTGTCTTCTACTGCGGATAAATCCTTCCGGGGATCG CGGCTGCTACTTCAACCATAGCTAGCGCTATTTCCGACTTTTACGAGGATGATGCGAGTGGCGGACCGGAGTGGCGAGTTTAAAGAAAGAAAGCGCTAG GTCTGATGTTACTAATAGCTATTCTAGTTGTTTATTTCTTATTTCTGAATACATTTTATATCTCTTATTTCCGGAACAGTCCAGAGGGCTAACTGTTGTA ATAAGAATGTTTTCGATAGTGCCAGTGTGTTGCTGTATTGGTGTCTGTATGGAGGGTTGACTCTTGTCTCTGGGTATGATGGTGTATTTGCGAGCAAT TTTTTTTGGGAATTGGCGGGGATTAACATTTATCTCTTGGCGCTTTGGGGGATGAGTTTTTGGAGCGTGGACGCTAGTCTTACAGAGGTCTCTTT GGGATGGGAATGTTTTTGTGTCGCCACGGTTAAGTTGAGAGAGAAAAGGGGACTTTGA

010, 019	ATGTTAGTGAAGCTTAATGAAAACTCTGTAACGCTTTGTCTTTAGTTGCAATACAGGCGAAATGCATGCTTCCATTGTTAGCTTTCCCATATTTGTTTGGC GTATTAGAACAGGGTGTCTTTTTCGAGGCTAGTAGTGGCTGAAGCATTAGCTTTTTATGTTTTCGACTGTGTGCTTTATAGATTTTGATATAAGTGGCGTTCAAGTA ATAGTCGATGCGAAAGAGGAAAGAGAGGTAGAAAGCAAAGTTTTTTTTCAATATATTGCTGCTAGGGTTGGATTATTAATTTTTCTTCTGTTTTTGGTTTGA GGTGATATCTATTTTTGGGGCGCCGATGTGTTTGGTAGTTATATGGCTTTTTTGTTTTGGGTATGATTTCTCAGTCTAATTAATTAATCTCCAAGCAGTTGAA AATAACTGGTTGCTGGCAACATTTGTAGTCTCTTCAAGAGTTACTCGGTTTATAGCCGCTATGCTTTGTACATAAGGGGACGGATGTTTTCTTCTGTTCCAT CATATTTGGCAGGTAGCTTTTTAGTTTACAGGGGAGCGGATTTTGGAGTTTCTACTATCGTTTTGGTTTGTAGTGAATTAAGAGGATTAGAGGTGATGTTGTTG TCTCATTACTGTGGAGTGGTCGTCATCTGTTTCTAGGGAACCTATCAGTTACTTTATTCGTGGTGCAAATGTTTTAATTTTGGCTGGTGTTCAAATAGTGCTG CTGTGTCAGTTTATGCACCTCTCCGAGAAAATAATTAAGTACTCAAGCCTAGCGAGGGCATGTAATCAGTTATTTTTGCCAAAAGTTGTAAGAGCTTTGGGCC TCTCTCTGTAACGGGAAAGAAACAGCCCTTTGCTTTTACGTTTCTGGAATAACATCTCAAGTATGCTATGCGTTTTCTTCTTCCGTTTTTATC TTTTCTCTATATTTCTGTTGGGTTTTAGGAGTGATTCCGGGTTTTAGTAGAAAGGTTTTCTTCTAATGTATTGATGTGCGCCAGCCGATGTTTTGTTGGTTGCT AATTCTATGTTTGGTGCAGTAGGGCTGAGTTAATCGAGGGCAAACCTACTTTGCTTATCTGTTTCTATCATTGGGGTTTGCTGTTTTGATTTCCCTGGTT ATGTCCTATCTTCTCTGATACCGGGGCTGCGATGACTTTTGTGCTGGCGGAGGCTTTGCTTTTATTTGCCTTCTCTGTAAATATCGTGGGAAGCCAAGAC ATGGATGA
07, 08	ATGATTTTTGCCCTTTTGGCTGCGTTTATTACGGCGCTCAAGGGCTTTTTTATGCCCATCTTTTGGATGAAGTGCAGTATGCCAATGTAAGCTACTACCTCT CATGCTGGGGTGGGAGTATTGTTATTGGCTCTGGGGTTATAATACGCTGTCTACTGAAATTCCGATATTGGCGAAAGAAGAGCTCTGAGTGTGTAAT GATTTTATACGGCAAGTTAAGGTAACGGGTTTTGTATACTGGCTACTGCTCTGACTTTAATCCGCTCGCTAGTTATATGACCGGAATGTCGCTCTCGTTTCAA GTGCTCTTGGTTGTTCAAGTTTTAGTATTCTTTTTGTTTACTATTGATCTGATGGTGGTGAAAGGACGGCTGGATTTTGTGGTTATGCGAGGCAGTTATTTCT AAGAAATGCTGTCACTGCTGCTGCGGGCTTTTTATTTGCGCATCTTTCTGCAGACCTCGTTGTGACGGTTGCGGCAGAGGCTCTTGTGTGCAGTTATATTTTCT CTCGTGGGTTCTTGTGTTTTTGGATTTTCTGGTGTCCGAGTTTAAAGTTTTTGTAAAGTATGCTACTTATGCTTGTACTTTAGTTGGAGCGTTTTTCC AGTTTGTGATAGACTGCTAGCCTCTTCTGTGCTGAGAACGGAGGAGTTCTCTCGGTTCTCGTACTTTTCTTGTGCATAATGGCTGGGCTTCCGTACAGCA GTTGATGAATACTAGGGTGATTACCGTTTTACCAGAAATGTGTGAGAAGGGGGCAAGGGTTGGGTATCGTTATGTAGTTAAGATTTCTCTTGTGATGGCGCTA CTCATGCTATTGTCATTGACGACTGGAATGTTTGTCTCCAAGCTCTTGGCTTGTGGCTGATTGGTTTGTAGATTAACATATGTTGGGGAGTGGTTTTGTGTT GGTTGCATAGTTAGCTGGGAGTTTACTCTTTTACTCTTTGCTGATGGGGCTAGATTTTTGTGCTCAAGATTGCTGCTATGCTTTTCTGTTTTGTTG TGAGGCGCGTTAATATTTAAAGTGTTCCTCTCGAATACAGGGCTTTGGGGTTTTGCTTTAATGGTGCTGTCGGGATTCTTGGTGTTTTTGGTGTGCTGATAT TGTCGGCTTGGTTTGAAGTCGTAATAAGATTTTTGTATTTAA
09	ATGATCCTTGCTCGCCTTTTCGCTGCTGCTGAATGTGGGGTTGAGGGCTGTAACCCTTATCTCGAAGTTCGCTCTTTTGTTTTTCTTGCTCGTTACCTCACGC CTACGGAGCTCGGGCTGTATGGACTTTTATGTCGAGTCGTCGCGTATGCTTTGTATTTTGTGCGCTTCGATTTTATGCATATAGCACGCCTGAAATGCTGAA GTGCGCAGAGGCAAGCGTGGGCGTATGTTACGAGATCAGCTGGTTTTGACGGCTATTCTCTATCTAGATTTTCATTCCATGCTCTTTGTCGATTTTCATTTTA ACCTTCTACCCTGGTCTGTTGTTGCTGGTGTCTGCGGTTTCTGGCTGCTGGTCTGGAACATGGAATCAAGAGTTGATGGATTTGATGCTCTTGTCTGCGCCAA CTCTTGCCGGATGGACATTGTTCTTCCGGTCAGCGGCTTGGGCATTGATTGTAGTTTTGTGTCATGGCTTCGATCCGTCGCTAAGGAACCTTCACTTTGTTTT GTTAGGCTGGGTGATGGGTGACGCTTTAGCGCTTGTATCTCATTAAAGATTTGCGGCGCATGATCCCTTGGATTGGCAGATGCCGCTGGAGTGGTTGTG GATATGGAAGGAGTACAGGGTGGCATTGCCCTCTCTTGATTTCGACTTGTGTCAGTGGTGGGCTTCTTACCTTGGATCGATAGCTGGGTGCGAGCAATTTCCGG GCTGGAGGTTCTTGGTCTGACTGATTGTTACGAGTATGGCTGCTGCTGTTTGTGGCTTTTCTAGACGAGGGTTTTTACACTATATATCGGGGATGATTA GTAGGTTTCAGTGTGGAGAAGCGGATTCCCTCAAGACCTTGGGGCGACGCTGGGCTCCAGACAATAGTTGTATGCCCTGGTATTTAGTGGCTTTGCTCTAT TTCTGTGCGGTCCCGTCATAGCTTGGCTTGGCAAGGATTTCTATTGAGCTGCAGCTGCGAATGTTTCTTGGGCTTGGCAGCTATAGTCTATATGCAATTGAG CATGATTGCTCATTAGCGCTTTATGCGCAGGGGCGATGATCGCCCTATAATTTTCACTCATATTCTCGGTTTCTCGGCTTCTTCCCTGTTGTTTTCTGGGGAG GAGAGATCTGCAGATACTACCGTACCCGTAGGGTTGTGTGTAGCGTTTTCCCTTATACTAATGTGAAACTGATGGCTATTGGCGCTGACGCTAGGCA GTATCGGTTTTTTTTGA
012	GTGAGCCGAATTTTGAATATCGGTTTTCGCTGGTCTAACTCTATTAATAAATTTCTTTTAGTCTTTTTCCTGGCACATTTTATGAATGCCGAGGATGTTGGCATT TATGGTCTTGTGGCTGCGACTATTGGTTATGGAGTGATATAGTCGGATTTGAATTTCTATAATTACTCTAATCGTGAGTTAGTCATCGCTCCACAGAGTGAATGG TTACCCTTGATACGAGATCAATTTCTCCTATATCTCTAATATATGTAGTGACTTTGCCTTTTATTTGTACAGTCTTTTGGGGTGGATGGCTTCCCTGGCGGATTT TTCAATTTTGTGACTCTTTTGTACTTTGAACATATTGCCAAGAGTTCAATAGAAATTTGGTTGCTGCTTCAAGCAATATTGGCAAGCGTGGTCTTTTTG TTCGTAGCGGAATCTGGTCTAGTTAGTTATTCTATGTATGTGGTTCGATGCTCAGTTTTCGATGCTACAGTTCACTTTCTATAGCTGATTATATCTGCTGTT CGCATGTATTATAGCGATTTATCAAATCTTCTCGCTTAGGTAAATTTGCGTGGCAGCCGCCAGTAAATTTGGAAGTTGGATACGATTTCAAATCTACAAGTGTAGGTGCATATACGATCTTTGT AGGATGGTACCCGCTGCTCTATCTTTTGGATGTCAGGAGTTTTTGTCTTATCTTCTCGGCTAATAAGTCCCGCTAAGAATGAATGCAGCGACTGACTTTTG AGAAAGTGAGCTGCTGAGTTAACTATTAATAGTGTGATTGTAATATTTTCTCTTCTGTTGTTTCTGCTGTTTTCGCTGGAATCTTATTAGTACTTGGCTTCTTCC TGTTTATAAAGAAAACTTAGATATGTTGTACTGGCTACTTTTCCGAGTGCTCTTTATGGGCTCAGCACGATACCTCATCTAGGTTTGTATGCTTATGGTCGAGA TAGACCAATATTACATTTCCCAATTATGTGGGTTTTGTGTCTTCATCTCTGCTCCTACTTATTTCTTCTCTTGGGGAGTAAGCTCTATTGCAGTCTCAATGGCT ATTTCATTTTTTTTTATCTTTGCTTGGAAACATCTGCATATTTTCTTTTGTAAAGATGCAAATAATTA
03, 015	GTGGGTTTGAGCCTTTTAAAGAATTCCTTCTCCAACCTGATTGGCTCAGCTCTTCCCGCTGTGGTCGATTGCCGGCGCTGGGGTATATGGCGCGGGAGCTG GAGACAGCCCTTTTCGAGCTGCAATGCTGATATGGGCTTTGGTTGGGTCAGCGAAGTATTTTCGATGCTGGGCTCGGTAAGTCAGTGGTAAGGCAAAATGCCA TCTCTTCAGCGGAGGCTGAAAACAGGACGACCATCTAGGCTTTCCCTGCTGTTTTGTTCTCTCGGGGGGGCTGGCGGCTGCATTTGGTCCACTTTTTTG CGGAATATTTGGTTGTAGATATATCAAGGTTGATCGTTCTCTCTATGAGGATGCCTTGACGGGAACCTCGAGTGGCGGGCCCTGTGATTCCCTTCTTTTAGCAT CCTTGGTATTACAGGGTTATCTCGAGGGGGTGGAGGATTTTTATCTTTTAAATAGTATAGGGCTCTATCAGGAACCTTACTTATCTTCTCCGGTAGCCTTTTTTA CTATTTGAGAAGACCTTTTCTCATTGATCTATGGGCTGCTTTTGCAGGGGCTGGTTCTGCTTTCTGATTGCATTAATTTTCCGCTCGTTGTCAGTTTGG ACGTGGCGGTGGGATGTTAAGGTTCTTAAACGCTTATAAGCTTTGGTAGTTGGCTGACTATACAAATATAATTAGTCTGTCATGGTCTATATGGATAAATTC TGATAGCAAGAATTACGGGTGTCAGGAGAACTTGATATATTGCTGCACCATCCGAGTTGATAAATCGTATGTCTATTCTGCTGTAGCTATTACGCGTGCAGTATT TCCTCGTTATCTGCTTTGGGGGGGCGAGGATCTGCCTCTGTGAAGAGACAGGCTCTCCTTATTCTGGAGGATTGGTTCTACCTATAATTATTGTTCTATTTTT TGTAGCGCCTTTGGGTTTGGGCATATGGTTGGGTCAGAGTACTCGGGCGGGAACCTGGCCAGAGCTGCTCAGGTTTTCAGATGCTCTGTAGGTTATTGTTCAATTCGATTG CACTAGTTCCATATAAATCTCCAGCGGAAGGATATTCTCGGACAGCAAGCAATGGTGATCTCTTGGAGGAGCTGCTTCCCTATTTGATGCTGATGACTTTTCGG TTCAGCAATGGGGGTTGTGCGAGCGGCATCCATCTGGTCTTAAAGATGGCTGTGGACTGCATTTTGTAGGCTTATCTGGACTCGAAGTGA
04	TTGCTTGAGGGATATGGCTTGTAGCTTGGCTAGGAATCTTTTGAACCTTTTGGGGTACTGATCTTCTTGGCGGCGTGTGCTGCTATCGGTTATCTGG CCAGAGTTTTGGGGTCGAGAATTTTGGGCTTCTGACCTTGTCTTTGCCATCATTTGGATATGCCAGTATATTGACTTGGGTTTATCCAGAGCTGTTATCAGG GAGGTGGCTCTGAGTTCAGATAAAGTTTCGGAAGTCAACAAGGCTGTTGGGACTTCTCTGTAGTAGTTACTATTGCGGGTTTCACTTGTGCTTGTCTGTTG TACTTCAATAGCAACGCTTAGCCTCGTCGTTGGGAGTAACGGCGGGGAACCTGGCCAGACGTGGTATTGGGGCTCAACTACCTTAGTTTGGCAATAGTCCCC TGTGATTTAGTAGCGGCTGTGGTTCTCCTTTTTGGAAGGCGCTGGGATTTTGAAGAACTGAATTTCTAAAATATTTCTGTTTGGCTTGTGCTATCATTTCC TGCCGCTTGGGTTTGGATAAGTGGGACGAACGGTTTTCTGTGGCGATGCTGGGGCTCGTAGCCTCTCGTATATTCTGCATGCTGCTGGCGTATGTGTTTT GTGTGCTCCCGTTCCGAGTTCGAGTGCAGCTTTTTGATTATTTTACTTTCAAGCGCTGTGATCAACTATGGCGGCTGGATTCTGTTAGTAATTTTATAGCCCT GTAATGGGTCTATTTGATAGGTTCTTATTTCCAGCCATCTGGGGCGGCACTGTTGCCTTGTACTGACCCCCCTCCGAGGTTGATTGGAAGGTTGCTTCT GTTCCACGCTCATATCCCGGTCATATTTACGGCTTTGAGTGTGAACTTCTGATGATACAAACAGAGTTGCTTATAAGATGACCTTGTGTTAGTGGTGG CTTATCTTCAGCTCTTATTTCTTGGTAGTGACATTATCTTCTGTATGGCTTGGTGATAAGTATCTGGGGGAGGCGCTCTTGTCTCTCAAATCCTTGTGCT TGGCTTTTTGTTCAATCTCTGCGCGCAAATACCTTTGCCAAAATCAAGCTGAAGGTAATTCAGGTTGACAGCTATTTTACATATTTTTCAGAGGTGCTCCCAT TCTGGCTTTTGTGATTCTTCTAGTTCTACATTCTCCATAGTGGGGGCGGCAAT

Окончание таблицы.

O13, O14	ATGAATCCAAAAATATATTTTGAATCTGCTGGGATTAGGGCTTCCTTAATTATTGCCGCTCTGACAGTGCCACATCTCATTGCCACTGTAGGAGTTGAAAG GTTTGGCTTTCTTGCTCTGTCATGGGGGCTTATTGGCTATGCCGGAATACTTGATCTGGGGATAGGTCGAGCTGTTACTCAGAACTCTCCTCTATTTCGTGGC TCTGATGAGGAGATGAATTCATACACAATAATGAGTACAGCTATTCGATCACC GCCATTGTTGGTGGGCTGGGCTTTTCCCTGATTATCATATTTGGCCTCCT GGGGGGCGGAGAATTTTTTCCCATAAGATGTCAGTTCGCTTGAGCTAGAATTCTCTGTTTACTATTGGCTTTTGCCTTACCTTTGCAAGCTATAAGTGCTA CCTATAGAGGGGTGAATGAGGCGTATCTCAACTTCAAAGGGATCAACCTCTTACGTATCTTTCTTGGGCGACTAATTTTGGTGGTCTTTTCTAGTTTCTTTC TATGCAAAGGATCTTCATTATCTTGTAACTACCCCTTGCTGCTCGGGCTTTGGCTTTCTTTATATTCCGGCGTTTAGCTCATGGAGTACTCAAAGAAACACTG GTGGAGAGAAGTTGCAATATGATCGGCGTCAGGCTGTTGAGTTGTTCCGATTGGTGGTGGGTCAGTGAAGTAGTATAATAATCCTTTTCTTGTTCAGTC CGATAGGTTTTTATTGGTGTATTGCTGCTGTCAGCGGTAACCTCTTATGTAATCCATATGAAATCACTATTTCAGTCGATGATCCTTGTGGGTGCTGTTTC CACCGTTGCCCTTCCGTCTATATCAAAATTAATTCGCACTTCTTTGCTGAAGCTCTGGAGTGTTTAATAAATGGCTCTTGCCTGTGCTGTTGATAATGGGAG GAGGGATGCTTTGCCCTGGCTTTTCTTTTGGCCTTATTTTGAAGTTGTGGGTGGGGGATTATATAGGGGACGACTCTATCAGTGTAGGAAGGATCCTTTGTCT TGGAGTGTTTTCAATGCGTTGGGTGCTATGTTCTATTCTTTCTGCATGCCAACGCCAAGGTGAAAGAACTGCAATTTGCACTCCATAGAGCTACCAATAT TTATCCTCATTTTGATTATCTGATTCCACGGCATGGGATCGTGGGGCGGCTGTGCGTGGTTCGCTGAGAACATTGGCGGATACCATAGTGCTGTGCTTTT GAGCTATTTTTCAGGCTGGAGAGTGAAATTTGCTAACTGCTAG
----------	--

известном патогене *Salmonella* spp. [24]. При аннотации 20 кластеров О-антигена *P. aeruginosa* из международной базы NCBI ген *wzx* был обнаружен в 17 из 20 последовательностей О-антигена. Остальные гены *wzx* идентифицированы с помощью биоинформатического анализа с помощью программы rps-blast на основе данных белковых доменов синегнойной палочки из международной базы NCBI. По итогам выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *wzx* построена дендрограмма, отражающая степень гомологии его строения внутри 20 О-антигенных структур *P. aeruginosa* (рис. 2).

На наш взгляд, идентифицированные аллельные варианты гена *wzx* могут быть использованы для дифференциации типов О-кластера *P. aeruginosa*, что, в свою очередь, позволяет определять принадлежность к той или иной серогруппе *in silico* (таблица). С этой целью в ранее разработанную программу Pseudomonas Analyser была добавлена возможность поиска выявленных нами аллелей гена *wzx*, что обеспечивает типирование возбудителя синегнойной инфекции по 13 антигенным группам, используя для этого разницу в нуклеотидном строении гена *wzx*.

Стоит отметить, что в широко используемой программе PAST предусмотрено типирование по таким же 13 антигенным группам, которое осуществляется алгоритмическим сопоставлением строения 20 кластеров О-антигена из международной базы NCBI с О-антигеном в анализируемом геноме [22]. Таким образом, определение 13 групп О-кластеров *in silico* происходит только по наличию гена *wzx*, а не по всему набору генов О-антигена *P. aeruginosa*.

В естественной среде ЛПС *P. aeruginosa* характеризуется более разнообразным набором О-антигенов (20), несмотря на одинаковый набор генов. Поэтому мы решили изучить О-антигены более детально (рис. 3). Исходя из анализа данных, было установлено, что часть серотипов имеет большую степень сходства по нуклеотидному составу, но присутствуют минорные отличия в структуре генов О-антигена. Так, к примеру, если сравнить последовательности O5 и O2 серогрупп, то отличия их последовательностей заключаются лишь в полиморфизмах единичных нуклеотидов (SNP) гена *wzy*, на что и была нацелена программа PAST. При этом нами установлено, что часть генов при их трансляции в аминокислотную последовательность имела стоп-кодны, в результате чего белковый продукт был укорочен на 70% от его нормальной аминокислотной последовательности. Это приводило к изменению структуры ЛПС, как следствие, к изменению эпитопов. Так, например, в генном кластере ЛПС *Vibrio cholerae* инактивация гена *wbeT* в результате мутации

приводит к изменению антигенной структуры с биотипа Огава на биотип Инаба [25, 26].

В своем исследовании мы исходили из того, что при полногеномном секвенировании, несмотря на большой прогресс в этой технологии, случаются ошибки прочтений, что ведет за собой выпадение части нуклеотидов или какого-то небольшого участка нуклеотидной последовательности. Поэтому, чтобы повысить возможность типирования большего количества штаммов, мы основывались на вариативности аллелей гена *wzx* для каждого О-антигена или же для группы родственных по своему нуклеотидному составу О-антигенов. Алгоритмы программы PAST дополнительно используют для разделения сходных серогрупп SNP-полиморфизмы, а также сопоставление всего О-кластера, что, как мы считаем, может привести к ошибке при определении серотипа штамма.

Подобранный в нашем исследовании метод позволил увеличить количество типлируемых по серогруппе штаммов *P. aeruginosa*, а также повысить точность и исключить ошибки при секвенировании, что, по нашему мнению, является более надежным методом определения серогруппы.

Для валидации разработанного нами алгоритма использовано 345 геномов из базы NCBI с известными данными о серогруппе, полученными исследователями в ходе типирования штаммов агглютинирующими О-сыворотками.

В ходе сравнения было установлено, что результаты, полученные с помощью программы Pseudomonas Analyser, на 96% совпадают с информацией из базы данных NCBI. Результаты агглютинации О-сыворотками не совпали с результатами серотипирования по *wzx* гену у 15 штаммов из 345. Независимым инструментом для проверки этих 15 штаммов выступила программа PAST, также позволяющая определять серотип, исходя из данных полногеномного секвенирования. В результате проверки геномов выбранных штаммов программой PAST было установлено, что результаты программы PAST совпали с данными из NCBI у 4 штаммов, у 10 штаммов совпали с данными Pseudomonas Analyser, но не с данными NCBI, 1 штамм по результатам не совпал ни с данными PAST, ни с данными из NCBI.

Проанализировать все 345 штаммов с помощью программы PAST, рабочая версия которой находится на сайте «Центра Геномной Эпидемиологии» (<https://cge.food.dtu.dk/services/PAST/>), не представляется возможным ввиду отсутствия возможности пакетной обработки, работы только в онлайн-режиме и усложненной процедуры получения ответа для каждого генома индивидуально. Кроме того, время ответа для

каждого запроса может составлять от 5 до 15 минут. Эти аспекты мы постарались учесть для того, чтобы была возможность проведения оперативного анализа неограниченного числа штаммов.

Таким образом, разработанный нами способ позволяет проводить серотипирование штаммов *P. aeruginosa in silico*, используя данные полногеномного секвенирования на основе выявления различий в строении гена *wzx* внутри О-кластера. Разработанное программное обеспечение является кроссплатформенным, что упрощает анализ и предоставляет возможность неограниченного изучения баз данных, содержащих информацию о полногеномных данных *P. aeruginosa*.

Заключение

В ходе проведенного исследования был проведен анализ О-кластеров различных серогрупп, что позволило выявить среди известных 20 серотипов 13 аллельных вариантов гена *wzx* – одного из ключевых факторов синтеза ЛПС. Найдено 3 новых *wzx* гена О-кластера *P. aeruginosa*. В результате был предложен способ дифференциации серотипов *P. aeruginosa* на основе данных полногеномного секвенирования. По итогам работы ранее созданная программа дополнена возможностью проводить анализ серогруппы по различию в нуклеотидном строении последовательностей гена *wzx* с использованием данных полногеномного секвенирования.

Информация о финансировании

Полногеномное секвенирование проведено в рамках федеральной программы «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Financial support

Whole-genome 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 interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS – J Med Soc.* 2018;32(1):76-77. DOI: 10.4103/jms.jms_25_17
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015 Jul-Aug;21-22:41-59. DOI: 10.1016/j.drug.2015.08.002
- Valero A, Rodríguez-Gascón A, Isla A, Barrasa H, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility in Spain: Antimicrobial Activity and Resistance Suppression Evaluation by PK/PD Analysis. *Pharmaceutics.* 2021 Nov 8;13(11):1899. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111899
- Huszczynski SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens.* 2019 Dec 19;9(1):6. DOI: 10.3390/pathogens9010006
- Rocchetta HL, Burrows LL, Lam JS. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:523-553. DOI: 10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999
- Cryz SJ Jr, Pitt TL, Fürer E, Germanier R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 1984;44:508-513. DOI: 10.1128/iai.44.2.508-513.1984
- Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology.* 1996;142 (Pt 2):299-307. DOI: 10.1099/13500872-142-2-299
- Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2158-60. DOI: 10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003
- Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol.* 2011 Jun 1;2:118. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00118
- Liu PV, Wang S. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1990 May;28(5):922-5. DOI: 10.1128/jcm.28.5.922-925.1990
- Методические указания: Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями: МУ 3.1.2/4.2.3973-23 (утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю.Поповой 28 декабря 2023), 2023;12,17.
- Penketh A, Pitt T, Roberts D, Hodson ME, Batten JC. The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1983 May;127(5):605-8. DOI: 10.1164/arrd.1983.127.5.605
- Ojienyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl.* 1994;46:1-44.
- Li H, Du Y, Qian C, Li L, Jiang L, Jiang X, et al. Establishment of a suspension array for *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotyping. *J Microbiol Methods.* 2018 Dec;155:59-64. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.11.006
- Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One.* 2009 Nov 13;4(11):e7740. DOI: 10.1371/journal.pone.0007740
- Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 N 1116 (ред. от 15.04.2024) «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» – официальный текст документа [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://e-ecolog.ru/docs/OLqF39eUDURxbJPjFaxud?ysclid=m7ubzuxppu654169838&utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F (дата обращения: 01.07.2024).
- Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kutayav TV, Ivey RG, Zhou Y, Kaul R, Clendenning JB, Olson MV. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2002 Jul;184(13):3614-22. DOI: 10.1128/JB.184.13.3614-3622.2002
- Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics.* 2007 Mar 15;23(6):673-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm009
- 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 г.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):959-64. DOI: 10.1038/35023079
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 2006;7(10):R90. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r90

22. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1782-1788. DOI: 10.1128/JCM.00349-16
23. Islam ST, Fieldhouse RJ, Anderson EM, Taylor VL, Keates RA, Ford RC, et al. A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol. 2012 Jun;84(6):1165-76. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08084.x
24. Sundaresan S, Rathinavelan T. SSP: An In Silico Tool for Salmonella Species Serotyping Using the Sequences of O-Antigen Biosynthesis Proteins and H-Antigen Filament Proteins. J Mol Biol. 2023 Jul 15;435(14):168046. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168046
25. Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, et al. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. PLoS One. 2014 Nov 14;9(11):e108521. DOI: 10.1371/journal.pone.0108521
26. Karlsson SL, Thomson N, Mutreja A, Connor T, Sur D, Ali M, et al. Retrospective Analysis of Serotype Switching of *Vibrio cholerae* O1 in a Cholera Endemic Region Shows It Is a Non-random Process. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 5;10(10):e0005044. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005044
27. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1782-1788. DOI: 10.1128/JCM.00349-16
28. Islam ST, Fieldhouse RJ, Anderson EM, Taylor VL, Keates RA, Ford RC, et al. A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol. 2012 Jun;84(6):1165-76. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08084.x
29. Sundaresan S, Rathinavelan T. SSP: An In Silico Tool for Salmonella Species Serotyping Using the Sequences of O-Antigen Biosynthesis Proteins and H-Antigen Filament Proteins. J Mol Biol. 2023 Jul 15;435(14):168046. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168046
30. Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, et al. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. PLoS One. 2014 Nov 14;9(11):e108521. DOI: 10.1371/journal.pone.0108521
31. Karlsson SL, Thomson N, Mutreja A, Connor T, Sur D, Ali M, et al. Retrospective Analysis of Serotype Switching of *Vibrio cholerae* O1 in a Cholera Endemic Region Shows It Is a Non-random Process. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 5;10(10):e0005044. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005044
32. Sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchiya cheloveka, Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossiiskoi Federatsii A.Yu. Popovoi 28 dekabrya 2023), 2023;12,17. (In Russian).
33. Penketh A, Pitt T, Roberts D, Hodson ME, Batten JC. The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis. 1983 May;127(5):605-8. DOI: 10.1164/arrd.1983.127.5.605
34. Ojienyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl. 1994;46:1-44.
35. Li H, Du Y, Qian C, Li L, Jiang L, Jiang X, et al. Establishment of a suspension array for *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotyping. J Microbiol Methods. 2018 Dec;155:59-64. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.11.006
36. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS One. 2009 Nov 13;4(11):e7740. DOI: 10.1371/journal.pone.0007740
37. Prikaz Rospotrebnadzora ot 01.12.2017 N 1116 (red. ot 15.04.2024) «O sovershenstvovanii sistemy monitoringa, laboratornoy diagnostiki infektsionnykh i parazitarnykh bolezney i indikatsii PBA v Rossiyskoy Federatsii» – ofitsial'nyy tekst dokumenta [Electronic resource]. Available at: https://e-ecolog.ru/docs/OLqF39eUDURxbJPjFaxud?ysclid=m7ubzuoppu654169838&utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F (accessed 01.07.2024). (In Russian).
38. Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kutayav TV, Ivey RG, Zhou Y, Kaul R, Clendenning JB, Olson MV. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3614-22. DOI: 10.1128/JB.184.13.3614-3622.2002
39. Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. Bioinformatics. 2007 Mar 15;23(6):673-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm009
40. Kovalevich AA, Vodopyanov AS, Pisanov RV. Computer program «Pseudomonas Analyser» – a program for analyzing the data of whole – genome se-quencing of the causative agent of pseudomonas infection. Certificate of state registration No. 2023667063 dated 08/09/2023. (In Russian).
41. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000 Aug 31;406(6799):959-64. DOI: 10.1038/35023079
42. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol. 2006;7(10):R90. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r90
43. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1782-1788. DOI: 10.1128/JCM.00349-16
44. Islam ST, Fieldhouse RJ, Anderson EM, Taylor VL, Keates RA, Ford RC, et al. A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol. 2012 Jun;84(6):1165-76. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08084.x
45. Sundaresan S, Rathinavelan T. SSP: An In Silico Tool for Salmonella Species Serotyping Using the Sequences of O-Antigen Biosynthesis Proteins and H-Antigen Filament Proteins. J Mol Biol. 2023 Jul 15;435(14):168046. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168046
46. Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, et al. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. PLoS One. 2014 Nov 14;9(11):e108521. DOI: 10.1371/journal.pone.0108521
47. Karlsson SL, Thomson N, Mutreja A, Connor T, Sur D, Ali M, et al. Retrospective Analysis of Serotype Switching of *Vibrio cholerae* O1 in a Cholera Endemic Region Shows It Is a Non-random Process. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 5;10(10):e0005044. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005044
48. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. JMS – J Med Soc. 2018;32(1):76-77. DOI: 10.4103/jms.jms_25_17
49. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat. 2015 Jul-Aug;21-22:41-59. DOI: 10.1016/j.drug.2015.08.002
50. Valero A, Rodríguez-Gascón A, Isla A, Barrasa H, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility in Spain: Antimicrobial Activity and Resistance Suppression Evaluation by PK/PD Analysis. Pharmaceutics. 2021 Nov 8;13(11):1899. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111899
51. Husczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. Pathogens. 2019 Dec 19;9(1):6. DOI: 10.3390/pathogens9010006
52. Rocchetta HL, Burrows LL, Lam JS. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:523-553. DOI: 10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999
53. Cryz SJ Jr, Pitt TL, Fürer E, Germanier R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1984;44:508-513. DOI: 10.1128/iai.44.2.508-513.1984
54. Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. Microbiology. 1996;142 (Pt 2):299-307. DOI: 10.1099/13500872-142-2-299
55. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):2158-60. DOI: 10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003
56. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. Front Microbiol. 2011 Jun 1;2:118. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00118
57. Liu PV, Wang S. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1990 May;28(5):922-5. DOI: 10.1128/jcm.28.5.922-925.1990
58. Metodicheskie ukazaniya: Epidemiologicheskii nadzor za vnebol'nichnymi pnevmoniyami: MU 3.1.2/4.2.3973-23 (utverzhdeny rukovoditelem Federal'noi

Информация о соавторах:

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7178-8021

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
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Information about co-authors:

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Alexey S. Vodopyanov, PhD, MD, leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9056-3231

НОВОСТИ НАУКИ

Растущая угроза туляремии в центральной части США

Ученые из Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) изучили демографические закономерности, географическое распределение и тенденции заболеваемости туляремией, вызываемым *Francisella tularensis*.

В исследовании использовались данные надзора за туляремией, с 2011 по 2022 год.

Анализ географического распределения включал картографирование на уровне округов, в то время как демографические данные были сосредоточены на возрасте, поле, расе и этнической принадлежности.

Исследование показало, что заболеваемость туляремией в США выросла на 56% в период с 2011 по 2022 год по сравнению с предыдущим десятилетием. Всего за этот период было зарегистрировано 2462 случая, из которых 40% были классифицированы как подтвержденные, а 60% как вероятные. Увеличение вероятных случаев частично объясняется достижениями в диагностических методах, такими как переход на иммуноферментный анализ (ИФА), который более чувствителен, но менее специфичен, чем более ранние тесты на агглютинацию.

Годовые показатели заболеваемости варьировались от 0,041 до 0,064 на 100 000 населения, с заметными географическими и демографическими различиями. На четыре центральных штата – Арканзас, Миссури, Канзас и Оклахома – пришлось половина всех случаев, что указывает на концентрацию инфекций в этих регионах. Дети в возрасте от 5 до 9 лет и мужчины в возрасте от 65 до 84 лет продемонстрировали самые высокие показатели заболеваемости по возрасту.

У американских индейцев или коренных жителей Аляски показатели были примерно в пять раз выше, чем у белых, что указывает на значительные различия в состоянии здоровья.



Rich SN, Hinckley AF, Earley A, Petersen JM, Mead PS, Kugeler KJ.
Tularemia – United States, 2011–2022.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2025 Jan 2;73(5152):1152–1156. DOI: 10.15585/mmwr.mm735152a1

Формирование устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к препаратам на основе серебра

С.Э.Ржеусский¹, Т.Ф.Черных², Ю.А.Буковская², О.Ю.Богданова²

¹УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Изучено формирование устойчивости *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* к препаратам, содержащим серебро в виде наночастиц и ионов. Установлено, что при культивировании микроорганизма *P. aeruginosa* в среде, содержащей наночастицы серебра, нитрат серебра или протаргол, минимальная ингибирующая концентрация исследованных препаратов увеличивается в 4 раза уже через 5 пересевов и в дальнейшем остается стабильной. Наблюдается увеличение минимальной бактерицидной концентрации в 16 раз для растворов нитрата серебра и наночастиц серебра и в 4 раза для раствора протаргола. Бактерии *K. pneumoniae* формируют меньшую устойчивость по отношению к препаратам серебра: увеличение минимальной бактерицидной концентрации для раствора нитрата серебра – в 8 раз, для раствора наночастиц серебра – в 4 раза, для раствора протаргола – в 2 раза.

Ключевые слова: грамотрицательные микроорганизмы, инфекция, ожоговые и хирургические раны, резистентность, антимикробное действие, наночастицы серебра, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация

Для цитирования: Ржеусский С.Э., Черных Т.Ф., Буковская Ю.А., Богданова О.Ю. Формирование устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к препаратам на основе серебра. Бактериология. 2025; 10(1): 26–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-26-29

Formation of resistance of gram-negative microorganisms to silver-based drugs

S.E.Rzheusky¹, T.F.Chernykh², Yu.A.Bukovskaya², O.Yu.Bogdanova²

¹Vitebsk State Order of Peoples Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus;

²Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation

The formation of resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* to preparations containing silver in the form of nanoparticles and ions was studied. It was found that when the microorganism *P. aeruginosa* is cultivated in a medium containing silver nanoparticles with a maximum absorption spectrum in the range of 405–410 nm, silver nitrate or protargol, the minimum inhibitory concentration of the studied drugs increases 4 times after only 5 subcultures and subsequently remains stable. An increase in minimum bactericidal concentration by 16 times is observed for solutions of silver nitrate and silver nanoparticles, and by 4 times for a solution of protargol. The bacteria *K. pneumoniae* forms less resistance to silver preparations, increasing the minimum bactericidal concentration for a solution of silver nitrate by 8 times, for a solution of silver nanoparticles by 4 times, and for a solution of protargol by 2 times.

Key words: gram-negative microorganisms, infection, burn and surgical wounds, resistance, antimicrobial action, silver nanoparticles, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration

For citation: Rzheusky S.E., Chernykh T.F., Bukovskaya Yu.A., Bogdanova O.Yu. Formation of resistance of gram-negative microorganisms to silver-based drugs. Bacteriology. 2025; 10(1): 26–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-26-29

Для корреспонденции:

Черных Татьяна Фёдоровна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России

Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, лит. А
E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com

Статья поступила 12.01.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Tatyana F. Chernykh, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Address: lit. A, 14 Prof. Popov str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation
E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com

The article was received 12.01.2024, accepted for publication 31.03.2025

В последние годы ключевыми оппортунистическими возбудителями, связанными с оказанием медицинской помощи, являются такие грамотрицательные микроорганизмы, как *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Эти микроорганизмы могут вызывать гнойные воспаления ожоговых и хирургических ран, абдоминальные инфекции, сепсис и т.д. Специалисты отмечают тяжелое течение подобных заболеваний и высокий уровень летальности, связанный с ними [2].

Одной из причин сложного лечения инфекций, вызванных грамотрицательной микрофлорой, является формирование у бактерий резистентности к антибиотикам [3]. Она формируется по различным механизмам и приводит к частичной или полной потере активности противомикробного препарата [4, 5].

Одним из способов борьбы с резистентностью микроорганизмов является поиск новых веществ с антимикробным действием. Перспективными в данном плане выглядят наночастицы серебра, обладающие значительным антимикробным эффектом по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам [6, 7], микроскопическим грибам [8].

Целью настоящей работы является изучение формирования устойчивости *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* к препаратам, содержащим серебро.

Материал и методы

Объектами исследования являлись: водный раствор наночастиц серебра, полученных глюкозным синтезом в лаборатории Витебского государственного медицинского университета, с максимумом поглощения на спектрограмме в диапазоне 405–410 нм; раствор нитрата серебра; раствор протаргола аптечного изготовления. Спектр поглощения водного раствора наночастиц серебра получали на регистрирующем спектрофотометре Specord 250 относительно воды в кювете с толщиной слоя 1 см.

Микробиологические исследования проведены в микробиологической лаборатории (лицензия на работу с ПБА III–IV групп патогенности) Центра контроля качества лекарственных средств СПХФУ, аккредитованной Росздравнадзором, и Витебском государственном медицинском университете. В качестве тест-культур были выбраны бактериальные суспензии *K. pneumoniae* ATCC 700603 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 концентрацией $0,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, эквивалентной значению мутности 0,5 по МакФарланду. Микроорганизмы культивировали на жидкой среде Мюллера–Хинтон.

Исследование проводили по методу двукратных серийных разведений в 96-луночных планшетах. После определения значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) содержимое последней лунки, в которой отмечался рост микроорганизма, пересевали на бульон Мюллера–Хинтон. Далее с использованием полученного микробного изолята вновь проводили изучение антимикробного действия исследуемых веществ. Таким образом, в течение 20 пересевов бактерии росли в среде, содержащей серебро в концентрациях ниже МИК.

После каждого исследования на определение МИК содержимое чистых лунок пересевали на агар для определения

минимальной бактерицидной концентрации (МБК). Каждое исследование проводили в пяти повторностях.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты изучения формирования резистентности у штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 к действию серебра представлены на рис. 1, 2.

Установлено, что при культивировании *P. aeruginosa* ATCC 9027 в среде, содержащей серебро, уже после 2–3 пересевов МИК всех исследованных препаратов увеличивается. К 5-му пересеву она увеличивается в 4 раза и остается стабильной на протяжении всего дальнейшего исследования.

Показано, что аналогично МИК увеличивается МБК: в 16 раз для растворов нитрата серебра и наночастиц серебра и в 4 раза для раствора протаргола к 6-му пересеву (рис. 2). При дальнейших пересевах этот показатель не менялся.

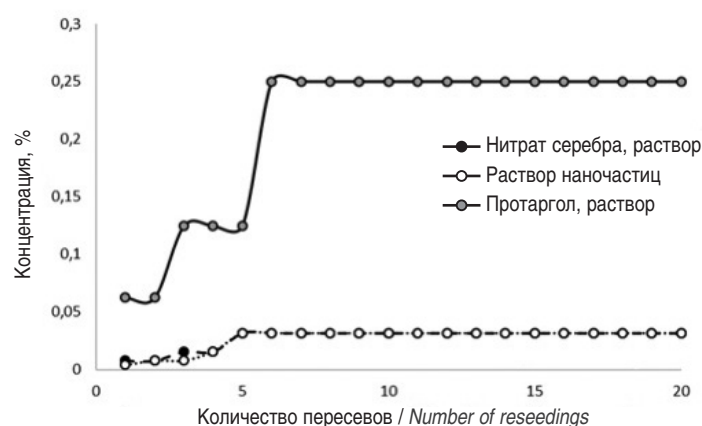


Рис. 1. Формирование устойчивости штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 к препаратам серебра в течение 20 пересевов (МИК). Ось ординат – концентрация действующего вещества, %: нитрат серебра; раствор протаргола; суспензия наночастиц серебра.
Fig. 1. Formation of resistance of *P. aeruginosa* strain ATCC 9027 to silver preparations over 20 reseedings (MIC). Ordinate axis – concentration of active substance, %: silver nitrate; protargol solution; suspension of silver nanoparticles.

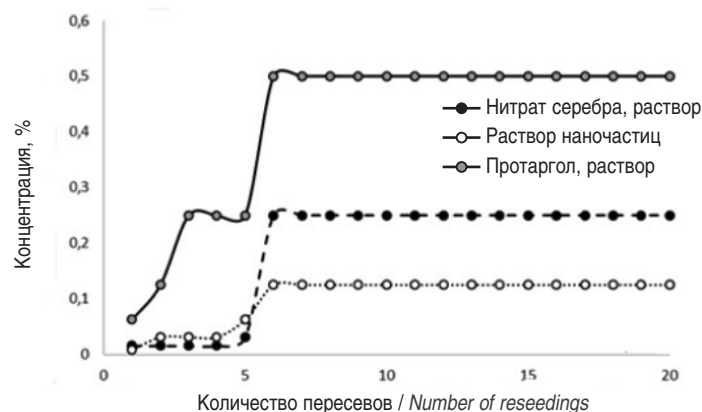


Рис. 2. Формирование устойчивости *P. aeruginosa* ATCC 9027 к препаратам серебра в течение 20 пересевов (МБК). Обозначения те же, что и на рис. 1.
Fig. 2. Formation of resistance of *P. aeruginosa* strain ATCC 9027 to silver preparations over 20 reseedings (MBC). The designations are the same as in Figure 1.

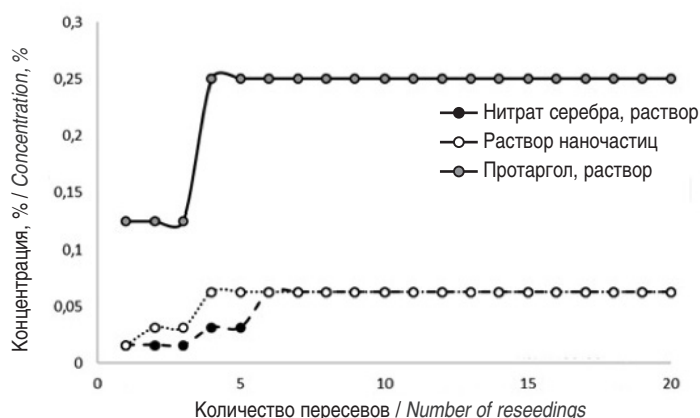


Рис. 3. Формирование устойчивости *K. pneumoniae* ATCC 700603 к препаратам серебра в течение 20 пересевов (МИК). Обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. Development of resistance of *K. pneumoniae* ATCC 700603 to silver preparations over 20 subcultures (MIC). The designations are the same as in Figure 1.

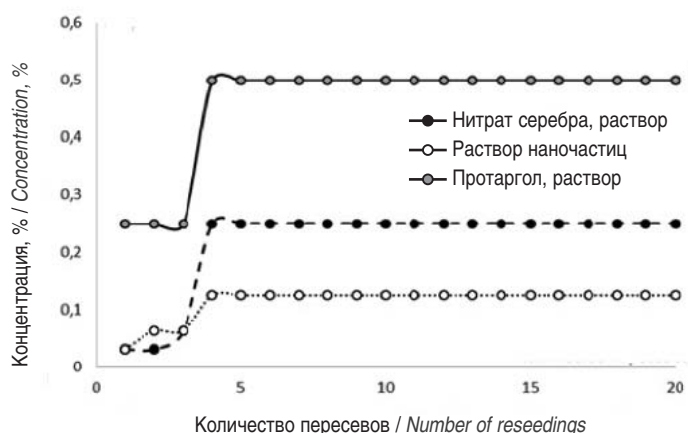


Рис. 4. Формирование устойчивости *K. pneumoniae* ATCC 700603 к препаратам серебра в течение 20 пересевов (МБК). Обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 4. Development of resistance of *K. pneumoniae* ATCC 700603 to silver preparations over 20 subcultures (MBC). The designations are the same as in Figure 1.

Сходные результаты наблюдали при изучении формирования резистентности к препаратам серебра бактерии *K. pneumoniae* ATCC 700603 (рис. 3).

Показано, что при культивировании данного микроорганизма в среде, содержащей серебро, уже к 4-му пересеву наблюдается увеличение МИК раствора нитрата серебра и наночастиц серебра в 4 раза. Установлено, что МИК протаргола увеличивается только в 2 раза.

Определено, что максимальное увеличение МБК препаратов серебра по отношению к *K. pneumoniae* ATCC 700603 также происходило к 4-му пересеву (рис. 4).

Установлено, что *K. pneumoniae* формируют меньшую устойчивость по отношению к препаратам серебра, чем *P. aeruginosa*. К 4-му пересеву наблюдали увеличение МБК для раствора нитрата серебра в 8 раз, для раствора наночастиц серебра – в 4 раза, для раствора протаргола – в 2 раза.

Показано, что препараты на основе наночастиц серебра в концентрации <0,015% не обладают антимикробным эффектом против инфекции, вызванной грамотрицательными

микроорганизмами, но способны формировать у бактерий некоторую устойчивость. В концентрациях 0,015–0,125% наночастицы скорее будут оказывать бактериостатическое действие, подавляя рост микроорганизмов, и только в более высокой концентрации можно говорить о бактерицидном действии. С этой точки зрения особое внимание следует уделить применению всевозможных косметических средств и изделий медицинского назначения с «ионами серебра» [9].

На антимикробную активность наночастиц серебра при практическом применении будет большое влияние оказывать как микробная нагрузка, как и наличие раневого отделяемого [10], поэтому выбор концентрации перспективных препаратов может осуществляться только в совокупности с указаниями по применению, такими, например, как элементы предварительного туалета раны или совместное использование нескольких усиливающих друг друга антисептиков.

Закключение

Установлено, что в условиях *in vitro* грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa* ATCC 700603 и *K. pneumoniae* ATCC 9027 способны вырабатывать устойчивость к серебру в виде наночастиц и солей, увеличивая их МИК в 2–4 раза, а МБК – в 2–16 раз. Устойчивость появляется уже ко 2-му, а максимальной силы достигает к 4–6-му пересеву.

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. Yakovlev SV, Suvorova MP, Beloborodov VB, Basin EE, Eliseev EV, Kovelchenov SV, et al. Multicentre Study of the Prevalence and Clinical Value of Hospital-Acquired Infections in Emergency Hospitals of Russia: ERGINI Study Team. Antibiot Khimioter. 2016;61(5-6):32-42. (English, Russian).
2. Тапальский ДВ, Карпова ЕВ, Акуленок ОМ, Окулич ВК, Генералов ИИ, Лескова НЮ, и др. Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* на фоне пандемии COVID-19: опыт многопрофильного стационара. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021;10,3(38):15-22. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22
3. Орлова НВ. Антибиотикорезистентность и современная стратегия антибактериальной терапии. Медицинский совет. 2022;16(8):89-97. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97
4. Даудова АД, Демина ЮЗ, Генатуллина ГН, Абдрахманова РО, Баева ГР, Ясенявская АЛ, и др. Антибиотикорезистентность. Вызов современности. Антибиотики и химиотерапия. 2023;68(3-4):66-75. DOI: 10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-66-75
5. Четвернина ЕА, Абрамовских ОС, Савочкина АЮ, Пыхова ЛР, Полтораки АЕ. Антибиотикорезистентность грамотрицательной флоры у пациентов с сепсисом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022;24(S1):46.

6. Rajesh S, Dharanishanthi V, Vinoth Kanna A. Antibacterial mechanism of biogenic silver nanoparticles of *Lactobacillus acidophilus*. J of Experimental Nanoscience. 2015;10:1143-1152. DOI: 10.1080/17458080.2014.985750
7. Ржеусский СЭ, Довнар АГ, Кугач ВВ. Изучение антимикробной активности повияргола. Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2015;14(6):120-126.
8. Hembram KC, Kumar R, Kandha L, Parhi PK, Kundu CN, Bindhani BK. Therapeutic prospective of plant-induced silver nanoparticles: application as antimicrobial and anticancer agent. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(sup3):S38-S51. DOI: 10.1080/21691401.2018.1489262
9. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. Nat Nanotechnol. 2018 Jan;13(1):65-71. DOI: 10.1038/s41565-017-0013-y
10. Saravanan M, Arokiyaraj S, Lakshmi T, Pugazhendhi A. Synthesis of silver nanoparticles from *Phenerochaete chrysosporium* (MTCC-787) and their antibacterial activity against human pathogenic bacteria. Microb Pathog. 2018 Apr;117:68-72. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.008
5. Chetvernina EA, Abramovskikh OS, Savochkina AYU, Pykhova LR, Poltorak AE. Antibiotikorezistentnost' gramotritsatel'noi flory u patsientov s sepsisom. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2022;24(S1):46. (In Russian).
6. Rajesh S, Dharanishanthi V, Vinoth Kanna A. Antibacterial mechanism of biogenic silver nanoparticles of *Lactobacillus acidophilus*. J of Experimental Nanoscience. 2015;10:1143-1152. DOI: 10.1080/17458080.2014.985750
7. Rzeussky SE, Dounar HG, Kugach VV. The study of antimicrobial activity of poviargol. Vitebsk Medical JoUrnal. 2015;14(6):120-126. (In Russian).
8. Hembram KC, Kumar R, Kandha L, Parhi PK, Kundu CN, Bindhani BK. Therapeutic prospective of plant-induced silver nanoparticles: application as antimicrobial and anticancer agent. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(sup3):S38-S51. DOI: 10.1080/21691401.2018.1489262
9. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. Nat Nanotechnol. 2018 Jan;13(1):65-71. DOI: 10.1038/s41565-017-0013-y
10. Saravanan M, Arokiyaraj S, Lakshmi T, Pugazhendhi A. Synthesis of silver nanoparticles from *Phenerochaete chrysosporium* (MTCC-787) and their antibacterial activity against human pathogenic bacteria. Microb Pathog. 2018 Apr;117:68-72. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.008

References

1. Yakovlev SV, Suvorova MP, Beloborodov VB, Basin EE, Eliseev EV, Kovelonov SV, et al. Multicentre Study of the Prevalence and Clinical Value of Hospital-Acquired Infections in Emergency Hospitals of Russia: ERGINI Study Team. Antibiot Khimioter. 2016;61(5-6):32-42. (English, Russian)
2. Tapalski DV, Karpova EV, Akulenok OM, Okulich VK, Generalov II, Leskova NYu, et al. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the background of the COVID-19 pandemic: experience of the multidisciplinary hospital. Infectious Diseases: News, Opinions, Training. 2021;10,3(38):15-22. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22 (In Russian).
3. Orlova NV. Antibiotic resistance and modern strategy of antibacterial therapy. Medical Council. 2022;16(8):89-97. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97 (In Russian).
4. Daudova AD, Demina JZ, Genatullina GN, Abdrakhmanova RO, Baeva GR, Yasyenyavskaya AL, et al. Antibacterial Resistance. The Challenge of Modernity. Antibiotics and Chemotherapy. 2023;68(3-4):66-75. DOI: 10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-66-75 (In Russian).

Информация о соавторах:

Ржеусский Сергей Эдуардович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

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

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

Information about co-authors:

Sergey E. Rzeussky, PhD in Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacy, Vitebsk State Order of Peoples Friendship Medical University

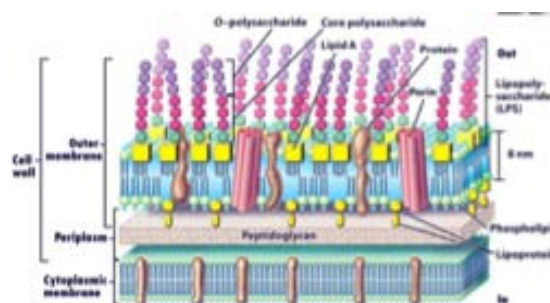
Yulia A. Bukovskaya, Assistant, Department of Microbiology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of the Russian Federation

Olga Yu. Bogdanova, PhD in Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of the Russian Federation

НОВОСТИ НАУКИ

Ответ псевдомонад на повреждение внешней мембраны

Проанализировали живые клетки с помощью корреляционной атомно-силовой микроскопии (АСМ) и флуоресцентной микроскопии. Показано, что силы вдавливания выше 7 наноньютонов запускают локальные, повторные и целевые сборки H1-T6SS в течение нескольких секунд после воздействия наконечника атомно-силового микроскопа (АСМ). Анализ соответствующих кривых силы АСМ показывает, что нарушение одного слоя клеточной оболочки необходимо и достаточно для запуска сборки H1-T6SS. Нонапептид полимиксина В, повреждающий внешнюю мембрану, также запускает сборку H1-T6SS. Это говорит о том, что у *P. aeruginosa* развился механизм обнаружения опасности, который позволяет быстро и точно задействовать антибактериальный H1-T6SS в ответ на нарушения внешней мембраны.



Brüderlin M, Kolesnikov M, Röthlin F, Lim RYH, Basler M.
Pseudomonas aeruginosa assembles H1-T6SS in response to physical and chemical damage of the outer membrane.
Sci Adv. 2025 Mar 7;11(10):eadr1713. DOI: 10.1126/sciadv.adr1713

Влияние времени замораживания на качество лиофилизатов диагностических чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов

А.В.Комиссаров, Г.Н.Гиненко, Е.А.Глазкова, М.В.Овчинникова, О.А.Лобовикова, С.А.Бадарин, Д.Н.Бибииков, Н.В.Синицына, О.С.Зинина, Ю.В.Синягина, К.С.Гумаюнова, Н.И.Костылева, А.К.Никифоров

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

Цель. Изучить тепловые характеристики чумных (Л-431С и Покровской (П)) и псевдотуберкулезного бактериофагов: температуру полного замораживания, нижнюю и верхнюю эвтектические температуры, а также исследовать влияние времени замораживания на качество лиофилизатов бактериофагов.

Материалы и методы. Использовались стерильные фильтраты фаголизатов бульонных культур чумного и псевдотуберкулезного микробов, содержащих взвесь частиц бактериофагов чумных (Л-413С и Покровской (П)) и псевдотуберкулезного, а также среда высушивания – пептон 10% и желатин 1,5%. Фильтраты фаголизатов фасовались по 1 мл в ампулы вместимостью 5 мл. Исследования проводились на сублимационной сушильной установке Epsilon 2-6D.

Результаты. Выявлены следующие значения температуры полного замораживания, нижней и верхней эвтектической температур чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов: -40, -35 и -28°C соответственно. Проведение процесса замораживания в течение от 2 до 24 ч не оказывает отрицательного воздействия на свойства препаратов.

Заключение. Полученные данные о тепловых свойствах бактериофагов позволяют правильно выбрать температурно-временные параметры процедур замораживания и сублимации. Результаты исследований дают возможность варьировать время начала сублимации препаратов.

Ключевые слова: лиофилизаты диагностических бактериофагов, замораживание, эвтектические температуры, качество

Для цитирования: Комиссаров А.В., Гиненко Г.Н., Глазкова Е.А., Овчинникова М.В., Лобовикова О.А., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Зинина О.С., Синягина Ю.В., Гумаюнова К.С., Костылева Н.И., Никифоров А.К. Влияние времени замораживания на качество лиофилизатов диагностических чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов. Бактериология. 2024; 10(1): 30–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-30-34

Effect of freezing time on lyophilisate quality of diagnostic plague and pseudotuberculosis bacteriophages

A.V.Komissarov, G.N.Ginenko, E.A.Glazkova, M.V.Ovchinnikova, O.A.Lobovikova, S.A.Badarin, D.N.Bibikov, N.V.Sinitsyna, O.S.Zinina, Yu.V.Sinyagina, K.S.Gumayunova, N.I.Kostyleva, A.K.Nikiforov

Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

Objective. To investigate the thermal characteristics of plague (L-431S and Pokrovskaya (P)) and pseudotuberculosis bacteriophages: complete freezing temperatures, lower and upper eutectic temperatures, and also to assess the effect of freezing time on the quality of lyophilisates of bacteriophages.

Materials and methods. We used sterile filtrates of phagolysates of broth cultures of plague and pseudotuberculosis microbes, containing a suspension of particles of plague (L-413S and Pokrovskaya (P)) and pseudotuberculosis bacteriophages, as well as a drying medium – peptone 10% and gelatin 1.5%. The filtrates of phagolysates were packaged 1 ml per ampoule with a capacity of 5 ml. Research was carried out on an Epsilon 2-6D freeze-drying unit.

Results. The following temperature values of complete freezing, lower and upper eutectic temperatures of plague and pseudotuberculosis bacteriophages have been established: -40, -35 and -28°C, respectively. Carrying out the freezing process for 2 to 24 hours does not have a negative effect on the properties of the drugs.

Conclusion. The obtained data on the thermal characteristics of bacteriophages make it possible to adequately select the temperature-time parameters of freezing and sublimation procedures. The research results indicate the feasibility of varying the onset time of drug sublimation.

Key words: lyophilisates of diagnostic bacteriophages, freezing, eutectic temperatures, quality

For citation: Komissarov A.V., Ginenko G.N., Glazkova E.A., Ovchinnikova M.V., Lobovikova O.A., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Zinina O.S., Sinyagina Yu.V., Gumayunova K.S., Kostyleva N.I., Nikiforov A.K. Effect of freezing time on lyophilisate quality of diagnostic plague and pseudotuberculosis bacteriophages. Bacteriology. 2025; 10(1): 30–34. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-30-34

Для корреспонденции:

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела экспериментальных фармацевтических форм ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Статья поступила 24.10.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Alexander V. Komissarov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Chief Researcher, Department of Experimental Pharmaceutical Forms, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

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

The article was received 24.10.2024, accepted for publication 31.03.2025

Бактериофаги широко применяются для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора производит зарегистрированные диагностические препараты бактериофагов: чумные – Л413С, Покровской (П) и псевдотуберкулезный. Данные медицинские изделия представляют собой лиофилизированные стерильные фильтраты фаголизатов бульонных культур чумного и псевдотуберкулезного микробов, содержащие взвесь частиц соответствующих бактериофагов чумных, а также среду высушивания – пептон 10% и желатин 1,5%. Проведенная недавно глубокая реконструкция производственных мощностей приготовления диагностических препаратов, в том числе приобретенного и введенного в эксплуатацию лиофилизационного оборудования, потребовала исследований по обоснованию параметров сушки препаратов. Следует отметить, что подбор параметров лиофилизации в каждом конкретном случае является сложной технологической задачей [1].

В технологии сублимационной сушки продуктов первой процедурой является замораживание, от правильного проведения которого зависит качество готового продукта. Основными свойствами вещества, на знании которых основывается возможность установить требуемые параметры процедур замораживания и дальнейшей сублимации, являются следующие тепловые характеристики: температура полного замерзания, нижняя и верхняя эвтектическая температуры [2–5].

В доступной литературе отсутствуют сведения о значении вышеуказанных характеристик. Также не раскрыто влияние времени замораживания на качество лиофилизатов диагностических чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов. Восполнению вышеуказанных пробелов и посвящена данная статья, что и является целью работы.

Материалы и методы

Все исследования с использованием патогенных биологических агентов проводили в соответствии с действующими Санитарными правилами и нормами [6].

Получение полуфабрикатов бактериофагов. В жидкую питательную среду засеивали бульонную культуру, соответствующий штамм-продуцент и маточный бактериофаг из расчета оптимальной множественности инфекции. Смеси инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение установленного времени. Полученные фаголизаты представляли собой взвесь частиц фага, остатков лизированных фагочувствительных клеток штамма-продуцента, интактных фагорезистентных клеток штамма-продуцента в питательной среде. Прозрачные или легко опалесцирующие фагофильтраты подвергали стерилизующей фильтрации и осуществляли контроль специфической стерильности. В работе использовали специфически стерильные фагофильтраты (полуфабрикаты).

Далее полуфабрикаты препаратов соединяли с защитной средой и разливали автоматическим дозатором PF-6 (Flexicon, Дания) в стерильные ампулы ШП-6, НС-3 (АО «Курскмедстекло», Россия) по 1,0 мл. Лيوфилизацию препаратов, включая замораживание, проводили в сублимаци-

онной сушильной установке Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). Ампулы герметизировали машинной запайкой с применением моноблока запайки ампул «Мастер» МЗ-400ЕД («Аврора пак инжиниринг», Россия).

Оценку влияния времени замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям, изложенным в нормативной документации на бактериофаги: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, pH, количество фаговых частиц [7–9].

Показатель «внешний вид» контролировали визуально. Лيوфилизированный препарат должен представлять сухую пористую массу светло-коричневого цвета в виде хорошо сформированной таблетки.

Растворимость (время растворения) устанавливали визуально, для чего добавляли в первичную упаковку 1 мл дистиллированной воды (температура $20 \pm 2^\circ\text{C}$) и встряхивали до полного растворения.

pH определяли потенциометрически с использованием pH-метр-милливольметра pH-410 («Аквион», Россия). Нормируемое значение – от 7,1 до 7,3.

Определение остаточной влажности, которая не должна превышать 3,0%, проводили с помощью инфракрасного термogravиметрического анализатора влажности MA 150 (Sartorius, Германия) весовым методом, описанным в ОФС 1.2.1.0010 [10]. Для контроля использовали содержимое ампул в количестве 0,15–0,20 г.

Определение количества фаговых частиц проводили методом агаровых слоев по Грация с соответствующими штаммами-продуцентами: *Yersinia pestis* EV – для чумных бактериофагов Покровской (П) и Л-431С, *Yersinia pseudotuberculosis* – для псевдотуберкулезного бактериофага. Бактериофаги должны содержать не менее 1×10^7 фаговых частиц в 1 мл.

Все данные в работе представлены в виде среднеарифметических результатов, в основном 3–5 повторностей. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли по стандартной методике определения грубых ошибок [11].

Ряд методических приемов описан в разделе статьи «Результаты исследования и их обсуждение».

Результаты исследования и их обсуждение

Определение тепловых характеристик бактериофагов

Такие свойства материала, как температура полного замерзания, нижняя и верхняя эвтектическая температуры, служат основой для установления необходимых температурно-временных показателей процессов замораживания и дальнейшей сублимации. С целью установления названных тепловых характеристик бактериофагов использовали методику, описанную L.Rey [12]. В ходе замораживания/оттаивания материала осуществляют одновременное определение температуры и электрического сопротивления изучаемого вещества. Температура полного замерзания соответствует значению, начиная с которого электрическое сопротивление остается постоянным. Нижняя и верхняя эвтектические температуры определяются по точкам перегиба прямой графика взаимосвязи электрического сопротивления и температуры. Исследования проводили с примени-

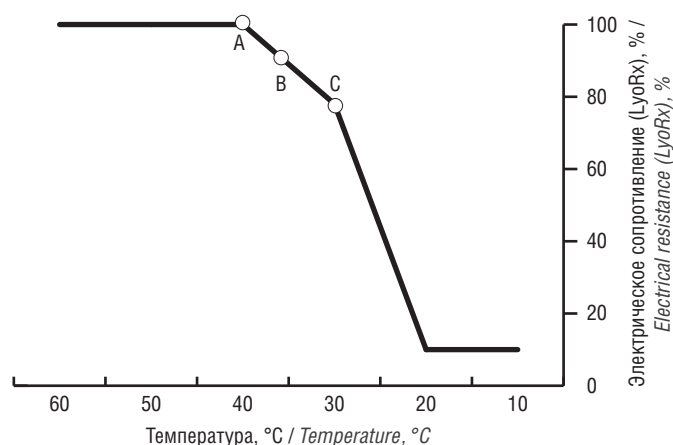


Рисунок. Кривая, выражающая взаимосвязь электрического сопротивления и температуры бактериофагов.
Figure. The curve reflecting the interdependence between electrical resistance and temperature of bacteriophages.

ем сублимационной сушильной установки Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия), на дисплее которой электрическое сопротивление отображается в процентах (LyoRx). Этот методический подход был успешно использован для определения вышеназванных показателей у специфических иммуногенных компонентов холерной химической вакцины [13] и живой туляреминой вакцины с новым составом среды высушивания [14].

Проведенные исследования, результаты которых представлены на рисунке, дали основания констатировать, что температура полного заморозания, нижняя и верхняя эвтектические температуры составляют -40 , -35 и -28°C соответственно. Следует сказать о том, что вышеназванные величины были практически идентичны для всех трех препаратов бактериофагов. Это объясняется схожей технологией их получения, в первую очередь одинаковым качественно-количественным составом сред высушивания. Пользуясь полученными значениями температур, а также рекомендациями ряда исследователей [3–5, 12–17], можно говорить о целесообразности замораживания бактериофагов до -40 – -45°C (на 5 – 10°C меньше величины нижней эвтектической температуры) и сублимации препаратов при температуре -28 – -35°C .

Влияние времени замораживания на качество лиофилизатов диагностических чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов

Ампулы с препаратом замораживали до температуры материала $-40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ на полках сублимационной сушильной установки Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). При этой температуре материал выдерживали в течение следующих промежутков времени: 2–3, 5–6, 10–11, 15–16, 23–24, 24–48, 48–72, 72–96 ч. Далее конденсатор-вымораживатель охлаждали до температуры $-65 \pm 5^{\circ}\text{C}$ и создавали остаточное давление в сушильной установке $0,1 \pm 0,01$ мбар. Процесс сублимации вели от температуры полок $-45 \pm 5^{\circ}\text{C}$ до $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$ со скоростью повышения температуры полок не более 5°C в час. При достижении температуры материала $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ давление в установке выравнивали с атмосферным и производили выгрузку ампул с последующей их запайкой.

Результаты исследований представлены в таблице. Следует сказать о том, что данные определенных характеристик были практически идентичными для всех трех наименований препаратов, поэтому в таблице отражены полученные сведения по одному из них – бактериофагу диагностическому чумному Л-413С. По внешнему виду полученные лиофилизаты представляли собой сухую массу светлороманового цвета в виде хорошо сформированной таблетки. Остаточная влажность для препаратов была практически одинаковой и составляла от $0,5$ до $0,9\%$. Значение pH растворов, полученных после растворения лиофилизатов, было от $7,1$ до $7,3$. Полученные лиофилизаты легко растворялись в 1 мл воды в течение в среднем 35 с. Количество фаговых частиц после лиофилизации снижалась в среднем в 10 раз в сравнении с жидкими препаратами. Значимое уменьшение количества фаговых частиц зафиксировано спустя 72 ч при хранении с температурой материала $-40 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Значения всех показателей соответствовали нормируемым требованиям. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод об одинаковом влиянии времени замораживания на показатели лиофилизатов. В практическом плане это дает возможность варьировать временем начала сублимации.

Таблица. Результаты исследований влияния времени замораживания на качество лиофилизатов бактериофагов
Table. Assessment of the effect of freezing time on the quality of bacteriophage lyophilizates

Время замораживания, ч / Freezing time, h	Остаточная влажность, % / Residual moisture, %		Растворимость, с / Solubility, seconds		pH		Количество фаговых частиц / Phage particle content	
	I	II	I	II	I	II	I	II
2–3	н/о / n/a	0,5	н/о / n/a	30	7,1	7,1	3×10^9	2×10^8
5–6		0,8		40		7,2		3×10^8
10–11		0,9		35		7,1		1×10^8
15–16		0,5		40		7,3		2×10^8
23–24		0,5		35		7,1		3×10^8
24–48		0,7		40		7,1		3×10^8
48–72		0,4		40		7,2		2×10^8
72–96		0,5		40		7,2		2×10^7

I – значение показателя жидкого препарата, II – значение показателя лиофилизата, н/о – не определяли. /
I – value of the indicator of the liquid preparation, II – value of the indicator of lyophilisate, n/a – not assessed.

Заключение

В результате проведения экспериментов по определению тепловых свойств диагностических чумных и псевдотуберкулезного бактериофагов выявлены значения температуры полного замерзания, нижней и верхней эвтектической температур: -40, -35 и -28°C соответственно, что позволяет говорить о целесообразности замораживания препаратов до -40–45°C и их сублимации при температуре -28–35°C.

В ходе исследований влияния времени замораживания на качество лиофилизатов бактериофагов установлено, что продолжительность данного процесса в течение 2–72 ч не оказывает отрицательного воздействия на свойства препаратов, что в практическом плане дает возможность варьировать временем начала сублимации.

Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках НИР 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (2021–2025 гг.), № гос. учета AAAA-A21-121012090066-4.

Financial support

The study was carried out within the framework of research work 89-2-21 “Scientific and applied aspects of the production and enhancement of drugs for immunoprophylaxis and diagnosis of dangerous bacterial and viral infections” (2021–2025), State Registration No. AAAA-A21-121012090066-4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Семакова АП, Кудрявцева ОМ, Попова ПЮ, Комиссаров АВ, Микшис НИ. Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы. Биотехнология. 2017;33(3):57-65.
2. Гусаров ДА. Лيوфилизация биофармацевтических белков (мини-обзор). Биофармацевтический журнал. 2010;2(5):3-7.
3. Комиссаров АВ, Бибииков ДН, Волох ОА, Бадарин СА, Синицына НВ, Костылева НИ и др. Лيوфилизация живых вакцин. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(3):56-73.
4. Нежута АА, Сербис ЕС. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов. Биотехнология. 2001;6:59-67.
5. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm Res. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023.75
6. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 2021.
7. Технические условия ТУ 9386-020-01898109-2008 «Бактериофаг диагностический чумной Л-413С, лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей».
8. Технические условия ТУ 9386-021-01898109-2008 «Бактериофаг диагностический чумной псевдотуберкулезный, лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей».

9. Технические условия ТУ 9386-022-01898109-2008 «Бактериофаг диагностический чумной псевдотуберкулезный, лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей».
10. Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1; 2023.
11. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М.: Медицина, 1962.
12. Rey L, May JC. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare, 2010.
13. Комиссаров АВ, Кочкалова НН, Синицына НВ, Бадарин СА, Костылева НИ, Волох ОА и др. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;1:90-93.
14. Бибииков ДН, Комиссаров АВ, Волох ОА, Кузнецова ЕМ, Бадарин СА, Авдеева НГ и др. Лيوфилизация микробов туляремии штамма 15 НИИЭГ. Биофармацевтический журнал. 2020;12(6):15-23.
15. Constantino H.R., Pikal M.J. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004.
16. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality. Am Pharm Review. 2002;5:48-53.
17. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. J Pharm Sci. 2001 Jul;90(7):860-71. DOI: 10.1002/jps.1039

References

1. Semakova AP, Kudryavtseva OM, Popova PYu, Komissarov AV, Mikshis NI. Stabilization by lyophilization of immunogenic antigens of *Bacillus anthracis* as part of a prototype recombinant vaccine against anthrax. Biotechnology. 2017;33(3):57-65. (In Russian).
2. Gusarov DA. Lyophilization of biopharmaceutical proteins (brief review). Biopharmaceutical Journal. 2010;2(5):3-7. (In Russian).
3. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilization of live vaccines. Bulletin of biotechnology and physical-chemical biology named after Yu.A. Ovchinnikov. 2018;14(3):56-73. (In Russian).
4. Nezhuta AA, Serbis ES. Development of scientifically based modes of freeze-drying of biological products. Biotechnology. 2001;6:59-67. (In Russian).
5. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm Res. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023.75
6. Sanitary rules and regulations SanPiN 3.3686-21 “Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases”, 2021. (In Russian).
7. Technical specifications TS 9386-020-01898109-2008 “Diagnostic plague bacteriophage L-413S, lyophilisate for preparing a solution for diagnostic purposes”. (In Russian).
8. Technical specifications TS 9386-021-01898109-2008 “Bacteriophage diagnostic pseudotuberculosis plague, lyophilisate for preparing a solution for diagnostic purposes”. (In Russian).
9. Technical specifications TS 9386-022-01898109-2008 “Diagnostic plague pseudotuberculosis bacteriophage, lyophilisate for preparing a solution for diagnostic purposes”. (In Russian).
10. General pharmacopoeial monograph 1.2.1.0010 Loss of weight upon drying. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV ed. Vol. 1; 2023. (In Russian).
11. Ashmarin IP, Vorob'ev AA. Statistical Methods in Microbiological Research. Moscow: Medicine, 1962. (In Russian).
12. Rey L, May JC. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare, 2010.
13. Komissarov AV, Kochkalova NN, Sinitsyna NV, Badarin SA, Kostyleva NI, Volokh OA, et al. Study of the process of freeze-drying of chemical cholera vaccine

- immunogens. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2016;1:90-93. (In Russian).
14. Bibikov DN, Komissarov AV, Volokh OA, Kuznetsova EM, Badarin SA, Avdeeva NG, et al. Lyophilization of microbes of tularemia vaccine strain 15 NIEG. Biopharmaceutical Journal. 2020;12(6):15-23. (In Russian).
15. Constantino H.R., Pikal M.J. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004.
16. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality. Am Pharm Review. 2002;5:48-53.
17. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. J Pharm Sci. 2001 Jul;90(7):860-71. DOI: 10.1002/jps.1039

Информация о соавторах:

Гиненко Григорий Николаевич, младший научный сотрудник
ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Глазкова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник
ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Овчинникова Мария Владимировна, кандидат биологических наук,
заведующая отделом ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора

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

Бадарин Сергей Анатольевич, научный сотрудник ФКУН Российский
противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Бибиков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора

Синицына Наталья Викторовна, научный сотрудник ФКУН Российский
противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Зинина Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора

Синягина Юлия Владимировна, младший научный сотрудник
ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Гумаюнова Кристина Сергеевна, младший научный сотрудник
ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Костылева Наталья Ивановна, научный сотрудник ФКУН Российский
противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук,
профессор, заместитель директора по экспериментальной
и производственной работе ФКУН Российский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Grigory N. Grinenko, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Ekaterina A. Glazkova, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Maria V. Ovchinnikova, PhD in Biological Sciences, Department Head,
Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor

Oksana A. Lobovikova, PhD in Biological Sciences, Head of the Department
of Biological and Technological Control, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Sergey A. Badarin, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Dmitry N. Bibikov, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher,
Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor

Natalya V. Sinityna, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Olga S. Zinina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher,
Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor

Yulia V. Sinyagina, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Kristina S. Gumayunova, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute
«Microbe» of Rospotrebnadzor

Natalia I. Kostyleva, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

Alexey K. Nikiforov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Deputy Director
for Experimental and Production Work, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»
of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Может ли ИИ предсказать следующую пандемию?

Угрозы инфекционных заболеваний для индивидуального и общественного здоровья многочисленны, разнообразны и часто неожиданны. Искусственный интеллект (ИИ) и связанные с ним технологии, которые уже поддерживают принятие решений человеком в экономике, медицине и социальных науках, обладают потенциалом для преобразования сферы и мощи эпидемиологии инфекционных заболеваний. Рассмотрено применение систем ИИ, которые объединяют машинное обучение, вычислительную статистику, поиск информации и науку о данных, к моделированию инфекционных заболеваний. Описано, как последние достижения в области ИИ могут ускорить прорывы в ответах на ключевые эпидемиологические вопросы, и обсуждены конкретные методы ИИ, которые можно применять к регулярно собираемым данным по надзору за инфекционными заболеваниями. Подробно обсуждается социальный контекст ИИ для эпидемиологии инфекционных заболеваний, включая такие вопросы, как объяснимость, безопасность, подотчетность и этика. Суммированы некоторые ограничения приложений ИИ в этой области и даны рекомендации о том, как эпидемиология инфекционных заболеваний может наиболее эффективно использовать текущие и будущие разработки в области ИИ.



Kraemer MUG, Tsui JL, Chang SY, Lytras S, Khurana MP, Vanderslott S, et al.
Artificial intelligence for modelling infectious disease epidemics.
Nature. 2025 Feb;638(8051):623-635. DOI: 10.1038/s41586-024-08564-w

Стабильность свойств вакцинного сибиреязвенного штамма СТИ-1 при длительном хранении

Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, Г.М.Титарева, И.А.Дятлов

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

Для иммунопрофилактики сибирской язвы у людей в нашей стране более 70 лет используется живая вакцина СТИ, которую готовят на основе бескапсульного вакцинного штамма СТИ-1, селекционированного в 1940 г. Н.Н.Гинсбургом с сотрудниками. Применение живых вакцин всегда должно сопровождаться постоянным наблюдением и периодической проверкой иммуногенных свойств вакцинных штаммов. Однако при приготовлении и длительных сроках хранения свойства вакцинных препаратов могут изменяться и не соответствовать требованиям отраслевого стандартного образца (ОСО) вакцины сибиреязвенной. Задачей нашего исследования является изучение стабильности биологических, генетических свойств и иммуногенности вакцинного сибиреязвенного штамма СТИ-1 разных сроков приготовления и хранения. Показано, что культуры, приготовленные в 1956, 1992, 2023 гг., сохранили свойства исходного штамма и соответствовали требованиям ОСО вакцины сибиреязвенной. В то же время культура штамма СТИ-1, изолированная из коммерческой вакцины, выпускаемой ранее НПО «Бактериофаг» (Тбилиси), показала изменения культурально-морфологических свойств и снижение иммуногенности.

Ключевые слова: сибиреязвенная вакцина, штамм, культура, сохраняемость, свойства

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Титарева Г.М., Дятлов И.А. Стабильность свойств вакцинного сибиреязвенного штамма СТИ-1 при длительном хранении. Бактериология. 2025; 10(1): 35–43. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-35-43

Stability of properties of the anthrax vaccine strain STI-1 during long-term storage

L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, G.M.Titareva, I.A.Dyatlov

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

For immunoprophylaxis of anthrax in people in our country, the live STI vaccine has been used for more than 70 years, which is prepared on the basis of the non-capsule vaccine strain STI-1, selected on May 29, 1940 by N.N.Ginsburg and his staff. The use of live vaccines should always be accompanied by constant observation and periodic verification of the immunogenic properties of vaccine strains. The objective of our study is to study the stability of the biological, genetic properties and immunogenicity of the vaccine anthrax strain STI-1 at different preparation times. It is shown that crops prepared in 1956, 1992, 2023, retained the properties of the original strain and met the requirements of the industry standard anthrax vaccine (ASV). At the same time, a culture of the STI-1 strain, isolated from a commercial vaccine previously produced by SPA "Bacteriophage" (Tbilisi), showed changes in cultural and morphological properties and a decrease in immunogenicity.

Key words: anthrax vaccine, strain, culture, persistence, properties

For citation: Marinin L.I., Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Titareva G.M., Dyatlov I.A. Stability of properties of the anthrax vaccine strain STI-1 during long-term storage. Bacteriology. 2025; 10(1): 35–43. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-35-43

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: info@obolensk.org

Статья поступила 19.06.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

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

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: info@obolensk.org

The article was received 19.06.2024, accepted for publication 31.03.2025

Для иммунопрофилактики сибирской язвы у людей в нашей стране более 70 лет используется лицензированная и выпускаемая в промышленных масштабах живая вакцина СТИ. Датой ее создания принято считать 29 мая 1940 г., когда Н.Н.Гинсбург с сотрудниками селекционировали стойкий бескапсульный мутант (вариант) сибиреязвенного микроба, получивший шифр СТИ-1 по названию Санитарно-технического института (ныне ФГБУ «48-й Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации») [1, 2]. При рассевах высоковирулентного сибиреязвенного штамма «Красная Нива» на плотной питательной среде по Schaefer (свернутая нормальная лошадиная сыворотка) постоянно, наряду с основной массой слизистых колоний с капсульными бациллами, получали сухие колонии, содержащие бескапсульные формы. Большая часть этих колоний сохраняла способность к диссоциации, и при повторных рассевах наряду с единичными сухими вырастал большой процент слизистых колоний. И лишь клон, обозначенный СТИ-1, оказался стойким – при многочисленных пассажах на питательных средах и через организм животных он не изменил свои свойства. Штамм-вариант характеризовался отсутствием способности продуцировать капсулу в оптимальных для этого условиях, в том числе и в организме животных. В соответствии с утратой способности капсулообразования штамм проявлял резко сниженную вирулентность для лабораторных животных (белых мышей, морских свинок) и был практически апатогенен для кроликов и овец [1, 3]. По результатам специально проведенных экспериментов установлена наследственная закрепленность отмеченных особенностей штамма СТИ-1.

Пройдя 70-летние испытания практикой, живая сибиреязвенная вакцина СТИ-1 может быть признана одним из достижений советской микробиологии и прикладной иммунологии.

Длительные наблюдения показали необходимость периодического контроля стабильности основных наследственных свойств вакцинных штаммов. Применение живых вакцин должно сопровождаться постоянным контролем сохранности культуральных и иммуногенных свойств вакцинных штаммов. Снижение иммуногенных свойств вакцинных штаммов описано в отношении туляремиальных и чумных вакцин, а также сибиреязвенных вакцинных штаммов Ценковского и СТИ-3 [2–4]. Изменения свойств штаммов проявлялись в характере роста культур на питательных средах – в так называемой диссоциации культур.

На протяжении всего времени существования вакцины СТИ систематически велись наблюдения за вакцинными штаммами СТИ-1 и СТИ-3. В 1960 г. были приготовлены эталонные культуры штаммов СТИ-1 (серия 34) и СТИ-3 (серия 35), свойства которых проверялись комиссионно в июне 1960 г. (в состав комиссии входили Н.Н.Гинсбург, А.Л.Тамарин, В.Р.Архипова, М.Н.Варданашвили) в Государственном контрольном институте им. Л.А.Тарасевича [5]. Комиссия отметила в бульонных культурах и на агаре типичный рост, свойственный указанным штаммам, и соответствие культурально-морфологических свойств требованиям Технических условий на сибиреязвенную живую вакцину СТИ. Одновременно проведенная проверка иммуногенности вакцины СТИ на кроликах и овцах на Орловской биофабри-

ке показала высокую эффективность штаммов СТИ-1 и СТИ-3.

Однако в 1964 г. появились сообщения об изменении характера роста и морфологии культуры эталонов штамма СТИ-1 1960 и 1957 гг. приготовления. В посевах на питательный агар эталонной культуры 1957 г. и, в еще большей степени, эталона 1960 г. приготовления [6] наблюдали повышенное количество РО-форм колоний, в бульонных культурах – склонность к диффузному росту с помутнением среды. На основании появления в культурах «атипичных» форм роста авторы сделали вывод об изменении иммуногенности эталона 1960 г. без проверки на животных, что связали с накоплением в микробной популяции «сапрофитизирующих» мутантов, которые могут обладать селективными преимуществами и вытеснять исходные высокоиммуногенные микробные особи» [6, 7].

В связи с этим были изучены свойства различных линий вакцинного штамма СТИ-1 и его музейных культур ранних генераций, длительно хранившихся в споровой форме с минимальным числом пересевов. В результате исследований установили, что всем требованиям соответствовала культура штамма СТИ-1, высушенная в 1943 г. из 3-й генерации после получения штамма и сохраняемая без пересевов в течение 18 лет в условиях низких температур. На основе этой культуры приготовили культуру 4-й генерации, которая по культурно-морфологическим свойствам, реактогенности и иммуногенности соответствовала первоначальной исходной культуре вакцинного штамма СТИ-1. После изучения свойств высушенная споровая культура была рекомендована в качестве нового эталона вакцинного штамма СТИ-1 (1962 г.) для производства живой сибиреязвенной вакцины [8].

Через 20 и 30 лет хранения культуры вакцинного штамма СТИ-1 свойства были исследованы Р.А.Салтыковым с сотрудниками [4]. Были изучены биологические свойства споровых культур, высушенных в 1944 г. и хранившихся при температуре не выше 10°C, а также вакцины СТИ, изготовленной в 1972 г. в институте им. Л.А.Тарасевича. Было отмечено, что основные биологические свойства (культурально-морфологические, безвредность и иммуногенность) за 30 лет сохранились без изменений. Наблюдалось лишь замедление прорастания спор в культуре после 30 лет хранения. На морских свинках и кроликах, иммунизированных разными препаратами вакцины СТИ, отмечали высокую иммунологическую эффективность.

Разработка молекулярно-генетических методов позволяет проводить оценку не только культурально-морфологических свойств, но и показателей, позволяющих оценивать генетическую стабильность и генетическую идентичность вакцинных штаммов.

За последние годы в России были проведены широкие исследования по изучению генетических особенностей возбудителя сибирской язвы, в том числе вакцинного штамма СТИ-1 [9–12]. Было показано, что геном штамма СТИ-1 представлен хромосомой и плазмидой rX01, которая включает детерминанты синтеза компонентов экзотоксина: отечного фактора (*суа*), летального фактора (*lef*) и протективного антигена (*pag*). *Pag* является основным иммуногеном вакцинного штамма СТИ-1 [13].

Основные исследования по типированию штаммов сибир-

реязвенного микроба были проведены P.Keim et al. [14, 15]. Авторы разработали систему многолокусного анализа вариабельных тандемных повторов (MLVA – multiple-locus variable-number tandem repeat analysis), позволяющую дифференцировать штаммы *B. anthracis* по восьми маркерным локусам: шести хромосомным (VrrA, VrrB1, VrrB2, VrrC1, VrrC2 и CG3) и двум плазмидным маркерам (pXO1-aat и pXO2-at). Ценность предложенного метода обеспечивала многолокусность анализа, наличие значительной вариабельности по каждому из локусов, возможность оценки как хромосомных, так и плазмидных локусов. Авторы исследовали 426 сибиреязвенных штаммов со всего мира и распределили их по восьми группам. Им удалось исследовать только один штамм российского происхождения – СТИ-1. Отсутствие восьмого маркерного локуса, ассоциированного с плазмидой pXO2, не дало возможности отнести этот штамм к какому-либо из 89 генотипов, но было четко доказано, что он относится к подгруппе A1.a.

Немного ранее была предложена комплексная система праймеров для идентификации *B. anthracis*, основанная на амплификации *pag*, *суа*, *lef* генов плазмиды pXO1, *сар* генов плазмиды pXO2 и хромосомного маркера (*Ba813*) гена хромосомной последовательности [16, 17]. Праймерами служили олигонуклеотиды, комплементарные к выявленным локусам генома сибиреязвенного микроба: *pag*, *lef*, *суа*, *сар* и *Ba813*. Схемы типирования были основаны на анализе переменного числа тандемных повторов (VNTR – variable number tandem repeat).

P.Le Fleche et al. использовали вариант VNTR-типирования, основанный на анализе минисателлитов (повторяющихся единиц длиннее 9 п.н.) в области гена *bclA*, детерминирующего синтез гликопротеина BcA – Ceb-Bams [18]. Метод позволяет, по данным разработчиков, анализировать результаты с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле и не требует секвенирования амплификатов. Предложено использовать данный методический подход для анализа генетического разнообразия штаммов *B. anthracis* по 14 хромосомным полиморфным локусам – минисателлитам с вариабельным числом тандемных повторов Geb-Bams. Эта схема типирования, по сравнению с типированием по P.Keim et al., позволяет выявлять различия между генотипами по большему количеству локусов, что обеспечивает дополнительные возможности генетической дифференциации близких по происхождению штаммов возбудителя сибирской язвы.

В коллекции «ГКПМ-Оболensk» находятся на хранении несколько вариантов вакцинного штамма СТИ-1 из разных источников и разных сроков хранения. Одной из задач контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов является сравнение их с ОСО. У штаммов, предназначенных для воспроизведения, проверяются показатели, характеризующие свойства препарата и его компонентов. Для каждой партии живой сибиреязвенной вакцины стандартными аттестуемыми показателями являются: общая концентрация спор, процент живых спор, определение посторонней микрофлоры, стандартность препарата, стабильность, однородность, специфическая безопасность и иммуногенность, которые должны контролироваться в течение срока ее хранения. С учетом современного развития молекулярно-генетических исследований, характеристики партий вакцинных препаратов должны быть дополнены MLVA-, VNTR-

типированием и секвенированием образцов. На наш взгляд, такая проверка вакцинных штаммов необходима с целью как контроля стабильности штаммов, находящихся на хранении, так и сохранности эталонной культуры с установленными молекулярно-генетическими характеристиками.

Цель исследования – изучение культурально-морфологических, иммунобиологических, молекулярно-генетических свойств четырех вариантов вакцинного сибиреязвенного штамма СТИ-1, находящихся на хранении, и оценка их стабильности.

Материалы и методы

В работе использовались споровые культуры вакцинного штамма СТИ-1 разных мест приготовления и разных сроков хранения из коллекции «ГКПМ-Оболensk» (табл. 1). Некоторые культуры приготовлены на основе штамма, выделенного из коммерческих вакцин (Тбилисского НИИВС НПО «Бактериофаг» и 48 ЦНИИ МО РФ). Все культуры хранились в 30% водном растворе глицерина при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Оценку биологических, генетических свойств и иммуногенности проводили по существующим методикам. Иммуногенность определяли по иммунному индексу (ИИ) – частное от деления LD_{50} для вакцинированных на LD_{50} для интактных животных [19].

Тестирование ДНК вариантов штамма СТИ-1 провели методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с набором праймеров *pag*, *lef*, *суа*, *сар*, *Ba813*, комплементарных к выявленным локусам генома сибиреязвенного микроба по ранее описанной методике [14, 15], а также молекулярным типированием методом MLVA по 24 локусам – по 7 локусам из 8 [16] и 17 локусам [18].

Праймеры для MLVA при типировании по схеме P.Keim et al. были синтезированы на фирме Amersham Pharmacia Biotech в соответствии с последовательностями, приведенными в работе P.Keim et al. [16]. Прямые праймеры были помечены $Sy^{TM}5$ амидитом (Pharmacia, 27-1801-02) для использования в автоматическом секвенаторе ALFII (Amersham Pharmacia Biotech). Эти же праймеры при подготовке фрагментов ДНК для секвенирования были синтезированы фирмой «Литех».

Выделение тотальной ДНК исследуемых культур проводили методом фенольной экстракции. Полученные образцы оценивали спектрофотометрически на чистоту и готовили раствор ДНК в концентрации 1 мкг/мл. Количество матрич-

Таблица 1. Спорные культуры вакцинного штамма СТИ-1
Table 1. Spore cultures of the vaccine strain STI-1

№	Партия / Batch	Год закладки / Year of storage	Место производства / Place of production
1.	22	1956	НИИЭГ МО РФ, г. Свердловск / RIEH of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sverdlovsk
2.	923	1992	ВНИИ ПМ, г. Оболensk / SRCAMB, Obolensk
3.	289	2023	ЦНИИ МО РФ, г. Киров / CRI of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov
4.	55	1990	НПО «Бактериофаг», г. Тбилиси / NPO "Bacteriophage", Tbilisi

Таблица 2. Биологические свойства споровых культур вакцинного штамма СТИ-1
Table 2. Biological properties of spore cultures of the vaccine strain STI-1

Партия, год закладки / Batch, year of storage	Показатель / Indicator	Требования нормативных документов / Requirements of regulatory documents	Соответствие / Compliance
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Внешний вид споровой культуры / Appearance of spore culture	Жидкость серовато-белого цвета с желтоватым оттенком, расслаивающаяся в статических условиях с образованием легко ресуспендируемого осадка / A greyish-white liquid with a yellowish tint, which separates under static conditions to form an easily resuspended sediment.	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Да/Yes
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Общая концентрация спор / Total spore concentration	$5,0 \times 10^9$ – $1,0 \times 10^{10}/\text{см}^3$	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Нет/No
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Концентрация живых спор (КОЕ) / Concentration of live spores (CFU)	$3,1 \times 10^9/\text{см}^3$	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Нет/No
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Количество розовых спор при окраске по Циллю–Нильсену	90%	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Нет/No
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Культурально-морфологические свойства / Cultural and morphological properties	Неподвижные грамположительные клетки с обрубленными концами, одиночные, парные, собранные в цепочки / Non-motile, gram-positive cells with truncated ends, single, paired, collected in chains	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Да/Yes
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Капсулообразование / Capsule formation	В организме и на питательных средах капсулу не образует / It does not form a capsule in the body or on nutrient media	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Да/Yes
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Рост на питательных средах / Growth on nutrient media	На плотной питательной среде из триптического гидролизата рыбной муки через 48 ч роста при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$ вырастают плоские, шероховатые, матовые колонии R-формы с неровными краями диаметром 2,5–5,0 мм. В жидкой питательной среде через 2–3 суток выращивания при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$ – рост в виде «комка ваты» на дне сосуда без помутнения среды / On a dense nutrient medium made from tryptic hydrolysate of fish meal, after 48 hours of growth at $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, flat, rough, matte colonies of the R-form with uneven edges with a diameter of 2.5–5.0 mm grow. In a liquid nutrient medium, after 2–3 days of growth at $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, growth in the form of a “cotton wool lump” at the bottom of the vessel without turbidity of the medium	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Нет/No
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Спорообразование	Через 4–5 суток выращивания на плотной питательной среде из триптического гидролизата рыбной муки с пониженным содержанием аминокислот при $32 \pm 1^\circ\text{C}$ в 80–90% клеток образуются центрально расположенные овоидные споры, окрашивающиеся по Циллю–Нильсену в розовый цвет / After 4–5 days of cultivation on a dense nutrient medium of tryptic hydrolysate of fish meal with a reduced content of amino nitrogen at $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$, centrally located ovoid spores are formed in 80–90% of the cells, staining pink according to Ziehl-Neelsen	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Да/Yes
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Отношение к фагам / Attitude to phages	Лизируется фагами К-ВИЭВ и FachВНИИВВиМ / Lysed by phages K-VIEV and Fah VNIIVViM	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Да/Yes
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Биохимические свойства / Biochemical properties	Отдельные клоны обладают гемолитической активностью, не обладают лецитиназной и фосфатазной активностью / Some clones have hemolytic activity and lack lecithinase and phosphatase activity	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Нет/No
22 (1956) 923 (1992) 289 (2023) 55 (1990)	Вирулентность / Virulence	LD_{50} при подкожном заражении белых мышей $1,0 \times 10^6$ спор / LD_{50} for subcutaneous infection of white mice 1.0×10^6 spores	Да/Yes Да/Yes Да/Yes Да/Yes

22 (1956)	Фенотип / Phenotype	Cap-Tox+	Да/Yes
923 (1992)			Да/Yes
289 (2023)			Да/Yes
55 (1990)			Да/Yes
22 (1956)	Дополнительные сведения / Additional information	Тест «жемчужного ожерелья» положительный / Pearl necklace test positive	Да/Yes
923 (1992)			Да/Yes
289 (2023)			Да/Yes
55 (1990)			Да/Yes
22 (1956)	Способ и условия хранения / Method and conditions of storage	В 30% водно-глицериновом растворе при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ / In a 30% water-glycerin solution at a temperature of $4 \pm 2^\circ\text{C}$	Да/Yes
923 (1992)			Да/Yes
289 (2023)			Да/Yes
55 (1990)			Да/Yes

ной ДНК составляло 100–500 нг, конечная концентрация праймеров – 0,2–0,4 мкМ.

Для определения нуклеотидных последовательностей Vrr-областей ПЦР-амплификаты клонировали в векторе pUC19 и секвенировали с использованием ALFexpress™AutoRead™ Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Определение нуклеотидных последовательностей и размеров фрагментов проводили на автоматическом секвенаторе ALFexpressII (Amersham Pharmacia Biotech) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя.

Для типирования по схеме P.Le Fleche et al. [18] праймеры заказывали на НПФ «СИНТОЛ» (Россия).

Определение размеров ПЦР-ампликонов проводили стандартным способом по показателю электрофоретической подвижности в геле агарозы (1,2%) с последующим окрашиванием бромистым этидием или в полиакриламидном геле (6%) с последующим окрашиванием серебром в сравнении с известными маркерами молекулярных масс (100 или 1000 bp ladder).

Результаты исследования и их обсуждение

В табл. 2 приведены результаты исследований биологических свойств споровых культур вакцинного штамма СТИ-1 разных приготовлений и разных сроков хранения.

Исследования показали, что культуры, приготовленные в

1956, 1992, 2023 гг., сохранили свойства исходного штамма и соответствовали требованиям ОСО вакцины сибиреязвенной [20]. Однако исследования свойств коммерческой вакцины СТИ, изготовленной в НПО «Бактериофаг» (г. Тбилиси), показали значительную гетерогенность популяции в культуре по морфологии колоний, характеру роста в бульоне, ферментативной активности, токсинообразованию.

Неоднородность популяции вакцинного штамма СТИ-1 в коммерческой вакцине НПО «Бактериофаг» выявили и другие исследователи [9, 21].

В эксперименте на белых мышах была определена вирулентность по величине LD_{50} , которая колебалась от 8×10^5 до 1×10^6 спор. На морских свинках и золотистых хомяках была оценена иммуногенность свойств четырех вариантов вакцинного сибиреязвенного штамма СТИ-1, находящихся на хранении.

Через 20 дней иммунизированных и интактных животных заразили подкожно разными дозами вирулентного штамма *B. anthracis* Ч-7 или тест-заражающего штамма *B. anthracis* 71/12 второй вакцины Ценковского. На основании полученных результатов рассчитали величины LD_{50} и ИИ, приведенные в табл. 3 и 4.

Исследования показали высокую иммуногенность вакцины СТИ-1 на основе 3-й генерации, приготовленные в 1956, 1992, 2023 гг. на разных технологических площадках. Одновременно отметили недостаточную эффективность

Таблица 3. Иммуногенность споровых культур штамма СТИ-1 в эксперименте на морских свинках
Table 3. Immunogenicity of spore cultures of strain STI-1 in an experiment on guinea pigs

Иммунизация вакциной (партия, год закладки) / Immunization with vaccine (batch, year of production)	Показатели иммуногенности при заражении / Immunogenicity indices during infection			
	вирулентным штаммом Ч-7 / virulent strain Ch-7		штаммом 71/12 второй вакцины Ценковского / strain 71/12 of the second Tsenkovsky vaccine	
	LD_{50} , спор/spores	ИИ/II	LD_{50} , спор/spores	ИИ/II
СТИ-1, партия 22, 1956 г. / STI-1, lot 22, 1956	$6,8 \times 10^4$	1000	$1,0 \times 10^6$	1000
СТИ-1, партия 923, 1992 г. / STI-1, lot 923, 1992	$7,5 \times 10^4$	1088	$2,8 \times 10^6$	2800
СТИ-1, партия 289, 2023 г. / STI-1, lot 289, 2023	$5,9 \times 10^4$	867	$1,5 \times 10^6$	1500
СТИ-1, партия 55, 1990 г. / STI-1, lot 55, 1990	$2,2 \times 10^4$	323		
Невакцинированные / Not vaccinated	68	–	$1,0 \times 10^3$	–

Таблица 4. Иммуногенность споровых культур штамма СТИ-1 в эксперименте на золотистых хомяках
Table 4. Immunogenicity of spore cultures of strain STI-1 in an experiment on golden hamsters

Иммунизация вакциной (партия, год закладки) / Immunization with vaccine (batch, year of production)	Величина LD ₅₀ (спор) вирулентного штамма Ч-7 для хомяков / LD ₅₀ value (spores) of virulent strain Ch-7 for hamsters		ИИ / Immunity Index (II)
	иммунизированных / immunized	интактных / intact	
СТИ-1, партия 22, 1956 г. STI-1, lot 22, 1956	843 ± 41	3 ± 2	281
СТИ-1, партия 923, 1992 г. STI-1, lot 923, 1992	3160 ± 52	9 ± 4	351
СТИ-1, партия 289, 2023 г. STI-1, lot 289, 2023	1000 ± 38	3 ± 2	333
СТИ-1, партия 55, 1990 г. STI-1, lot 55, 1990	521 ± 43	4 ± 3	128

ИИ – частное от деления LD₅₀ для вакцинированных на LD₅₀ для интактных животных. / II is the quotient of LD₅₀ for vaccinated animals divided by LD₅₀ for intact animals.

коммерческой вакцины НПО «Бактериофаг». Пониженную эффективность коммерческой вакцины НПО «Бактериофаг» можно связать с длительными последовательными пассажами эталонного штамма СТИ-1 на питательных средах при изготовлении очередных партий препарата. Это привело к тому, что в составе популяции штамма СТИ-1 разные клоны отличались по иммуногенности, причем различия составляли десятки раз [4].

При исследовании генетических свойств вариантов штамма СТИ-1 на 1-м этапе провели тестирование ДНК в ПЦР с набором праймеров *rag*, *lef*, *суа*, *сар*, *Ва 813*, комплементарных к выявленным локусам генома сибиреязвенного микроба по методу Ramisse and Patra [15]. На рис. 1 приведены примеры электрофореграмм ПЦР с праймерами *Ва 813* и *rag* для исследованных штаммов.

Анализ результатов ПЦР со всеми используемыми праймерами показал, что все четыре варианта культур СТИ-1 идентичны и являются «полноценными» вакцинными штаммами *B. anthracis*. В ПЦР выявлены четыре из пяти видоспецифических ПЦР-фрагментов – *суа*, *rag*, *lef* и *Ва 813*.

Отсутствует ПЦР-продукт с праймером *сар*, который характерен для капсульного штамма сибиреязвенного микроба.

Для генотипирования штаммов использовали метод многолокусного VNTR-типирования с использованием шести хромосомных – *VrrA*, *VrrB1*, *VrrB2*, *VrrC1*, *VrrC2* и *Cg3* и одного плазмидного маркера – *PXO1* [16]. Результаты определения величин варьируемых фрагментов по этим локусам приведены в табл. 5. Определение нуклеотидных последовательностей и размеров фрагментов проводили на автоматическом секвенаторе ALFexpress II фирмы Amersham Pharmacia Biotech с в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя.

Анализ результатов VNTR-типирования с использованием шести хромосомных – *VrrA*, *VrrB1*, *VrrB2*, *VrrC1*, *VrrC2* и *Cg3* и одного плазмидного маркера – *PXO1*, представленных в таблице 5, свидетельствует, что размеры фрагментов *VrrA*, *VrrC1*, *VrrC2* партии 55 (коммерческая вакцина НПО «Бактериофаг») отличаются от размеров этих же фрагментов других партий [16].

Для определения нуклеотидных последовательностей *Vrr*-областей ПЦР-амплификаты клонировали в векторе pUC19 и секвенировали с использованием ALFexpress™AutoRead™ Sequencing Kit фирмы Amersham Pharmacia Biotech. Нами были секвенированы семь фрагментов варианта штамма СТИ-1 партии 923.

Секвенирование клонированных фрагментов показало, что вариант штамма СТИ-1 партии 923 по локусу *CG3* является типичным представителем подгруппы A1.a, т.к. имеет аллель *CG3-153*, который, согласно данным P.Keim et al. [16],

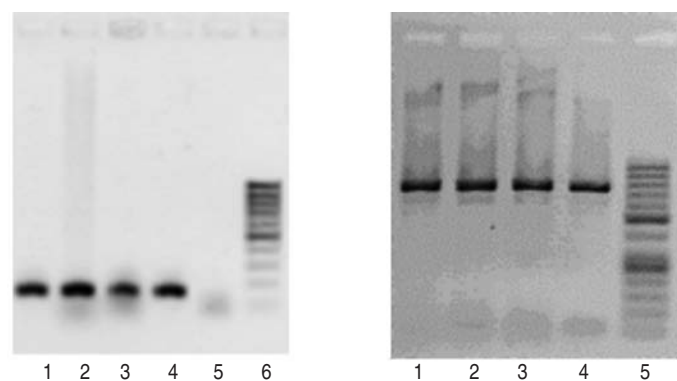


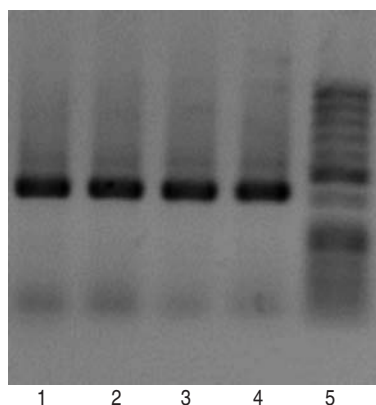
Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов: слева – с праймерами *Ва 813*. 1 – СТИ-1, партия 22; 2 – СТИ-1, партия 923; 3 – СТИ-1, партия 289; 4 – СТИ-1, партия 55; 5 – отрицательный контроль; 6 – маркер молекулярных масс 50 бп. Все фрагменты 152 п.о.; справа – с праймерами *rag*. 1 – СТИ-1, партия 22; 2 – СТИ-1, партия 923; 3 – СТИ-1, партия 289; 4 – СТИ-1, партия 55; 5 – маркер молекулярных масс 50 бп. Все фрагменты 747 п.о.
Fig. 1. Electropherogram of PCR fragments: on the left – with primers *Ba 813*. 1 – STI-1, lot 22; 2 – STI-1, lot 923; 3 – STI-1, lot 289; 4 – STI-1, lot 55; 5 – negative control; 6 – molecular weight marker 50 bp. All fragments are 152 bp; on the right – with primers *rag*. 1 – STI-1, lot 22; 2 – STI-1, lot 923; 3 – STI-1, lot 289; 4 – STI-1, lot 55; 5 – molecular weight marker 50 bp. All fragments are 747 bp.

Таблица 5. Величины фрагментов *Vrr*-областей вариантов вакцинного штамма СТИ-1
Table 5. Sizes of *Vrr*-region fragments of STI-1 vaccine strain variants

Вариант штамма / Strain variant	Размер <i>Vrr</i> -фрагментов / <i>Vrr</i> fragment size						
	<i>VrrA</i>	<i>VrrB1</i>	<i>VrrB2</i>	<i>VrrC1</i>	<i>VrrC2</i>	<i>cg3</i>	<i>pXO1</i>
СТИ-1, партия 22 / STI-1, lot 22	314	229	162	613	604	153	133
СТИ-1, партия 923 / STI-1, lot 923	314	229	162	613	604	153	133
СТИ-1, партия 289 / STI-1, lot 289	314	229	162	613	604	153	133
СТИ-1, партия 55 / STI-1 lot 55	312	229	162	615	601	153	133

Таблица 6. Молекулярное типирование вариантов вакцинного штамма СТИ-1 по 17 локусам
 Table 6. Molecular typing of STI-1 vaccine strain variants at 17 loci

Споровая культура / Spore culture	Размер фрагментов / Size of fragments															
	1L	3L	5L	13L	15L	21L	22L	23L	24L	25L	28L	30L	31L	34L	44L	51L
СТИ-1, партия 22	422	519	385	454	607	676	735	693	595	391	493	890	772	425	417	493
СТИ-1, партия 923	422	519	385	454	607	676	735	693	595	391	493	890	772	425	417	493
СТИ-1, партия 289	422	519	385	454	607	676	735	693	595	391	493	890	772	425	417	493
СТИ-1, партия 55	422	519	385	454	607	676	735	693	595	391	493	890	772	425	417	493


 Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов с праймерами L 44. 1 – СТИ-1, партия 22; 2 – СТИ-1, партия 923; 3 – СТИ-1, партия 289; 4 – СТИ-1, партия 55. Все фрагменты 417 п.о.
 Fig. 2. Electropherogram of PCR fragments with primers L 44. 1 – STI-1, batch 22; 2 – STI-1, batch 923; 3 – STI-1, batch 289; 4 – STI-1, batch 55. All fragments are 417 bp.

является определяющим диагностическим маркером для подгруппы A1.a.

Следующим этапом генетических исследований было молекулярное типирование методом MLVA по 17 локусам по P.Le Fleche [18].

В качестве примера представлены ПЦР-фрагменты, полученные при использовании праймеров Geb Vams 44. На рис. 2 приведены результаты ПЦР с праймерами L 44 [18].

Данные по остальным фрагментам всех четырех изученных штаммов представлены в табл. 6.

Проведенные исследования показали, что все изученные партии вакцинного штамма СТИ-1 являются идентичными при тестировании по схеме P.Le Fleche.

Закключение

Изучение культурально-морфологических, иммунопротективных и молекулярно-генетических характеристик образцов сибиреязвенной вакцины СТИ-1 разных мест приготовления и разного срока хранения показало, что длительность хранения при соблюдении условий хранения незначительно влияет на качество вакцины. Эта стабильность генетических характеристик вакцинного штамма СТИ-1 обуславливается тем, что возбудитель сибирской язвы представляет собой почти идеальную модель прокариотической клональной эволюции с редкой геномной рекомбинацией [22]. При закладке культуры необходимо соблюдать требования ОСО вакцины сибиреязвенной. Для приготовления вакцины СТИ-1 целесообразно использовать эталонные культуры, подвергнутые меньшему количеству пассажей. Вероятно,

именно из-за большого числа пересевов возникла гетерогенность популяционного состава маточной культуры коммерческой вакцины СТИ-1 НПО «Бактериофаг», приготовленной в 1990 г., что обусловило снижение ее иммуногенности и изменения культурально-морфологических свойств.

При проведении селекционной работы по стабилизации клеточного состава рабочих культур, используемых для производства сибиреязвенной вакцины, необходимо проводить молекулярно-генетические исследования, подтверждающие полную идентичность этих культур эталонным образцам.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Гинсбург НН. Сибиреязвенная вакцина СТИ (к ревизии вопроса о происхождении и сущности вакцинных штаммов). Сб. работ НИИЭГ Красной Армии. М., 1946; Вып. 1:5-85.
2. Гинсбург НН. Живые вакцины (история, элементы теории, практика). М., 1969.
3. Салтыков РА. Стабилизация иммуногенных свойств вакцинных штаммов бактерий. Журнал микробиологии. 1976;8:3-9.
4. Салтыков РА, Бакулов ИА, Гаврилов ВА, Уланова АА, Киваев ВА. Характеристика сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, хранившегося 30 лет в виде лиофилизированных спор. Журнал микробиологии. 1976;6:62-65.
5. Чалисов ИА, Тамарин АЛ. Патоморфология и бактериология иммунизаторного процесса при сибиреязвенной вакцине СТИ. Сб. работ НИИЭГ Красной Армии. 1946; В. 1:114-141.
6. Архипова ВР. Разработка эталона живой сибиреязвенной вакцины. В кн.: Антракс (Вопросы иммунологии, клиники и лабораторной диагностики). Под ред. Э.Н.Шляхова. Кишинев: Картия Молдовеняскэ, 1964:121-123.
7. Иванов ВН, Угодчиков ГА. Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. Киев: Наук. думка, 1984.
8. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Фирстова ВВ. Сибирская язва вчера и сегодня. М.: Издательство «Династия», 2021.
9. Кожухов ВВ, Строчков ЮИ, Сероглазов ВВ. Контроль генетической полноценности сибиреязвенных эталонных штаммов и вакцинных препаратов методом амплификации ДНК. Материалы научно-практ. конф., посвящ. 100-летию образования противочумной службы России (16–18 сентября 1997 г., Саратов). Т. 1. Саратов, 1997:221.

10. Старицын НА, Померанцев АП, Степанов АВ, Суковатова ЛВ. Плазмиды сибиреязвенного микроба: рестрикционный профиль и возможность рекомбинации. Биотехнология. 1994;6:14-16.
11. Тучков ИВ. Конструирование и внедрение в практику генодиагностической тест-системы для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Саратов, 2005.
12. Цыганкова ОИ. Фенотипическая и генетическая вариабельность штаммов сибиреязвенного микроба (теоретические и практические аспекты). Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Ставрополь, 2007.
13. Микшис НИ, Попова ПЮ, Семакова АП, Кутырев ВВ. Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017;4:112-126. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-112-126
14. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000
15. Keim P, Kalif A, Schupp J, Hill K, Travis SE, Richmond K, et al. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. J Bacteriol. 1997 Feb;179(3):818-24. DOI: 10.1128/jb.179.3.818-824.1997
16. Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, Thérassé J, Guesdon JL. Specific oligonucleotide primers for rapid identification of *Bacillus anthracis* strains. Proc. Inter. Workshop on Anthrax. Winchester, England. September 19-21. 1996;45-46.
17. Ramisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
18. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001;1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2
19. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, Шишкова НА, Тимофеев ВС, Миронова РИ, и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Под ред. И.А.Дятлова. М.: Издательство «Династия», 2021.
20. Касина ИВ, Саяпина ЛВ, Анисимова ТИ, Шевцов АН, Лобастов ВС, Бывалов АА, и др. Изучение нового отраслевого стандартного образца вакцины сибиреязвенной живой сухой. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;Вып. 91:64-66.
21. Цыганкова ОИ, Фунтикова ТН, Буравцева НП, Еременко ЕИ. Изучение некоторых свойств субкультур сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 in vitro. В сб.: Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Матер. Росс. науч. конф. Саратов, 1993:192.
22. Pearson T, Busch JD, Ravel J, Read TD, Rhoton SD, U'Ren JM, et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 14;101(37):13536-41. doi: 10.1073/pnas.0403844101
23. Ginsburg NN. Sibiryeazvennaya vaksina STI (K revizii voprosa o proiskhozhdenii i sushchnosti vaksinnnykh shtammov). Sb. rabot NII EG Krasnoi Armii. Moscow, 1946;Vyp. 1:5-85. (In Russian).
24. Ginsburg NN. Zhivye vaksiny (Istoriya, elementy teorii, praktika). Moscow, 1969. (In Russian).
25. Saltykov RA. Stabilization of the immunogenic properties of vaccinal strains of bacteria. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1976 Aug;(8):3-9. (In Russian).
26. Saltykov RA, Bakulov IA, Gavrilov VA, Ulanova AA, Kivaev VA. Characteristics of the anthrax vaccinal strain STI-1 preserved for 30 years in the form of lyophilized spores. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1976 Jun;(6):62-5. (In Russian).
27. Chalisov IA, Tamarin AL. Pathomorphology and bacteriology of the immunizing process with anthrax vaccine STI. Proceedings of the NIEG of the Red Army, 1946;B. 1:114-141. (In Russian).
28. Arkhipova VR. Razrabotka etalona zhivoi sibiryeazvennoi vaksiny. V kn.: Antraks (Voprosy immunologii, kliniki i laboratornoi diagnostiki). Pod red. E.N.Shlyakhova. Kishinev: Kartya Moldovenyashke.1964;121-123. (In Russian).
29. Ivanov VN, Ugodchikov GA. Kletochnyi tsikl mikroorganizmov i geterogennost' ikh populyatsii. Kiev: Nauk. dumka, 1984. (In Russian).
30. Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Firstova VV. Sibirskaya yazva vchera i segodnya. Moscow: «Dinastiya» Publ., 2021. (In Russian).
31. Kozhukhov VV, Ctrochkov Yul, Seroglazov VV. Kontrol' geneticheskoi polnotsennosti sibiryeazvennykh etalonnykh shtammov i vaksinnnykh preparatov metodom amplifikatsii DNK. Materialy nauchno-prakt. konf., posvyashch. 100-letiyu obrazovaniya protivochumnoi sluzhby Rossii (16–18 sentyabrya 1997 g., Saratov). T. 1. Saratov, 1997;221. (In Russian).
32. Staritsyn NA, Pomerantsev AP, Stepanov AV, Sukovatova LV. Plazmidy sibiryeazvennogo mikroba: restriksionnyi profil' i vozmozhnost' rekombinatsii. Biokhnologiya. 1994;6:14-16. (In Russian).
33. Tuchkov IV. Konstruirovaniye i vnedreniye v praktiku genodiagnosticheskoi test-sistemy dlya vyyavleniya DNK vzbuditelya sibirskoi yazvy. Avtoref. diss. ... kand. med. nauk. Saratov, 2005. (In Russian).
34. Tsygankova OI. Fenotipicheskaya i geneticheskaya variabel'nost' shtammov sibiryeazvennogo mikroba (teoreticheskie i prakticheskie aspekty). Avtoref. diss. ... dokt. med. nauk. Stavropol', 2007. (In Russian).
35. Mikshis NI, Popova PYu, Semakova AP, Kutyrev VV. Licensed anthrax vaccines and experimental preparations at the stage of clinical trials. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2017;4:112-126. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-112-126 (In Russian).
36. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000
37. Keim P, Kalif A, Schupp J, Hill K, Travis SE, Richmond K, et al. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. J Bacteriol. 1997 Feb;179(3):818-24. DOI: 10.1128/jb.179.3.818-824.1997
38. Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, Thérassé J, Guesdon JL. Specific oligonucleotide primers for rapid identification of *Bacillus anthracis* strains. Proc. Inter. Workshop on Anthrax. Winchester, England. September 19-21. 1996;45-46.
39. Ramisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
40. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001;1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2
41. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, Shishkova NA, Timofeev VS, Mironova RI i dr. Metody izucheniya biologicheskikh i molekulyarno-geneticheskikh svoistv vzbuditelya sibirskoi yazvy. Pod red. I.A.Dyatlova. Moscow: Izdatel'stvo «Dinastiya», 2021. (In Russian).
42. Kasina IV, Sayapina LV, Petukhov VG, Anisimova TI, Shevtsov AN, Byvalov AA, et al. Elaboration and studying of a novel branch-wise standard specimen of dry live anthrax vaccine. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2006;1(91):64-66. (In Russian).
43. Tsygankova OI, Funtikova TN, Buravtseva NP, Eremenko EI. Izucheniye nekotorykh svoistv subkul'tur sibiryeazvennogo vaksinnnogo shtamma STI-1 in vitro. V sb.: Immunologiya i spetsificheskaya profilaktika osobo opasnykh infektsii. Mater. Ross. nauch. konf. Saratov, 1993;192. (In Russian).

References

22. Pearson T, Busch JD, Ravel J, Read TD, Rhoton SD, U'Ren JM, et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 14;101(37):13536-41. DOI: 10.1073/pnas.0403844101

Информация о соавторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Nina A. Shishkova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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

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

Galina M. Titareva, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии полости рта могут быть связаны с изменениями в работе мозга по мере старения людей

Генотип аполипопротеина и дефицит оксида азота являются факторами риска возрастного снижения когнитивных функций. Микробиом полости рта играет важную роль в поддержании биодоступности NO при старении.

У 60 пациентов с легкими когнитивными нарушениями высокая относительная распространенность *Neisseria* была связана с лучшими показателями когнитивных функций, касающихся исполнительной функции и зрительного внимания, а в здоровой группе *Neisseria* коррелировала с рабочей памятью.

Высокая распространенность *Haemophilus* и *Haemophilus parainfluenzae*, которые встречались вместе с *Neisseria*, коррелировала с лучшими показателями исполнительной функции в группе с легкими когнитивными нарушениями. Не было никаких различий в пероральных концентрациях нитрата или нитрита между группами с легкими когнитивными нарушениями и здоровыми. Линейный дискриминантный анализ определил *Porphyromonas* как предиктор легких когнитивных нарушений, а *Prevotella intermedia* как предиктор статуса носительства APOE4. Основные выводы: большая распространенность орального *P. intermedia* связана с повышенным генетическим риском деменции (генотип APOE4) у лиц с легкими когнитивными нарушениями до постановки диагноза деменции, и что вмешательства, способствующие оральному *Neisseria-Haemophilus* и подавляющие модули, в которых доминирует *Prevotella*, имеют потенциал для задержки когнитивного снижения.



L'Heureux JE, Corbett A, Ballard C, Vauzour D, Creese B, Winyard PG, et al. Oral microbiome and nitric oxide biomarkers in older people with mild cognitive impairment and APOE4 genotype. *PNAS Nexus*. 2025 Jan 28;4(1):pgae543. DOI: 10.1093/pnasnexus/pgae543

Гены резистентности к бета-лактамным антибиотикам бактерий *Klebsiella pneumoniae*

О.Н.Колотова, Л.В.Катаева, Т.Ф.Степанова

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

Изучены уровень резистентности и наличие генов бета-лактамаз изолятов *Klebsiella pneumoniae* в монокультуре и в ассоциациях с другими бактериальными патогенами.

Изоляты *K. pneumoniae* получены из мокроты пациентов моноинфекционного госпиталя с диагнозом «пневмония» и из аутопсийного материала (ткани легкого). Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Наличие детерминант резистентности осуществляли методом полимеразной цепной реакции с применением набора «БакРезиста».

Результаты исследования показали, что изоляты *K. pneumoniae*, выделенные из мокроты, обладали более высоким уровнем антибиотикорезистентности, а также более широким спектром детерминант резистентности по сравнению со штаммами, находящимися в монокультуре. Резистентность к бета-лактамным антибиотикам и карбапенемам изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из мокроты, обеспечена присутствием генов сериновых бета-лактамаз класса А, включая blaKPC, blaOXA-48-like, blaOXA-51-like и металло-бета-лактамазы blaNDM-like. В аутопсийном материале штаммы *K. pneumoniae*, находящиеся в монокультуре, обладали широким спектром генов бета-лактамаз и проявляли высокий уровень множественной резистентности к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: *K. pneumoniae*, отделяемое нижних дыхательных путей, гены бета-лактамаз, пандемия COVID-19

Для цитирования: Колотова О.Н., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. Гены резистентности к бета-лактамным антибиотикам бактерий *Klebsiella pneumoniae*. Бактериология. 2025; 10(1): 44–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-44-49

Genes of resistance to beta-lactam antibiotics of *Klebsiella pneumoniae* bacteria

O.N.Kolotova, L.V.Kataeva, T.F.Stepanova

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

The levels of resistance and the presence of beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates in monoculture and in associations with other bacterial pathogens were studied.

K. pneumoniae isolates were obtained from the sputum of mono-infective hospital patients diagnosed with pneumonia and from autopsy material (lung tissue). Antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method. The presence of resistance determinants was assessed by PCR using the "BakResist" kit. According to the study results, *K. pneumoniae* isolates from sputum exhibited a higher level of antibiotic resistance and a wider range of resistance determinants compared with strains in monoculture. Resistance to beta-lactam antibiotics and carbapenems in *K. pneumoniae* isolates from sputum is mediated by genes for serine beta-lactamases of class A, including blaKPC, blaOXA-48-like, blaOXA-51-like, and metallo-beta-lactamases of the blaNDM-like.

K. pneumoniae strains in monoculture from autopsy material possessed a wide range of beta-lactamase genes and showed a high level of multidrug resistance.

Key words: *K. pneumoniae*, lower respiratory tract infections, beta-lactamase genes, COVID-19 pandemic

For citation: Kolotova O.N., Kataeva L.V., Stepanova T.F. Genes of resistance to beta-lactam antibiotics of *Klebsiella pneumoniae* bacteria. Bacteriology. 2025; 10(1): 44–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-44-49

Для корреспонденции:

Колотова Ольга Николаевна, младший научный сотрудник
бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский НИИ краевой
инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Адрес: 625026, Тюмень, ул. Республики, 147
Телефон: (3452) 28-99-94
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадzor.ru
ORCID: 0000-0002-0798-5549

Статья поступила 01.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Olga N. Kolotova, Junior Researcher of bacteriological laboratory,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute

Address: 147 Republic str., Tyumen, 625026, Russian Federation
Phone: (3452) 28-99-94
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадzor.ru
ORCID: 0000-0002-0798-5549

The article was received 01.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Бактерии *K. pneumoniae* являются представителями сапрофитной микробиоты верхних дыхательных путей [1]. При этом они признаны значимым патогеном, способным поражать различные органы и системы при инфекционных заболеваниях. Распространение инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных штаммами *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра, представляет серьезную клиническую угрозу [2, 3]. Многообразие механизмов антибиотикорезистентности у *K. pneumoniae* приводит к формированию устойчивости к разным группам антимикробных препаратов [4, 5]. Устойчивые к карбапенемам штаммы *K. pneumoniae* отнесены к «критическим» патогенам и являются одной из приоритетных угроз ввиду ограниченности ресурсов антибиотикотерапии [6, 7]. Имеются многочисленные данные об эпидемических вспышках в стационарах, обусловленных изолятами *K. pneumoniae* [8–11]. Поэтому актуально изучение патогенного потенциала штаммов *K. pneumoniae*, циркулирующих в стационарах медицинских организаций и приводящих к неблагоприятному исходу заболевания.

Цель исследования: изучить уровень резистентности и наличие генов ферментов бета-лактамаз изолятов *K. pneumoniae* в монокультуре и в ассоциациях с другими бактериальными патогенами, выделенных из мокроты пациентов моноинфекционного госпиталя с диагнозом «пневмония» и из аутопсийного материала (ткани легкого).

Материалы и методы

В исследование включены 65 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из отделяемого нижних дыхательных путей пациентов, получавших лечение в моноинфекционном ковидном стационаре города Тюмени с апреля 2020 г. по февраль 2022 г. А также 30 изолятов *K. pneumoniae* из аутопсийного материала (ткани легких от 30 пациентов) за тот же период времени.

Идентификацию бактерий проводили масс-спектрометрическим методом с использованием настольного времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Показатель подобия более 2,0 соответствовал высокому уровню видовой идентификации. Для определения генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам

использовали набор «БакРезиста» (ООО «ДНК-технология», Россия). Исследование методом полимеразной цепной реакции проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Чувствительность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллер–Хинтон (HiMedia, Индия). Для исследования взяты диски с амоксициллин-клавулановой кислотой, цiproфлоксацином, амикацином, цефтазидимом, цефотаксимом, имипенемом, меропенемом (ООО «НИЦФ», Россия).

Результаты анализировали в соответствии с Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» версии 2018-03 (актуальны в период исследования до 2021 г.), а также версии 2021-01.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью лицензионного программного обеспечения SPSS версии 26. Для выявления статистически значимых различий использовали точный критерий Фишера. Различия интерпретировали как достоверные при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Изоляты *K. pneumoniae*, выделенные из верхних дыхательных путей, более чем в 80% случаев находились в ассоциациях с другими бактериальными патогенами, такими как *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*, которые обладали множественной резистентностью к антимикробным препаратам. Более 50% изолятов *K. pneumoniae*, находящихся в монокультуре, проявляли резистентность к разным группам антибиотиков. При этом устойчивость *K. pneumoniae* в сочетании с указанными бактериальными патогенами составляла практически 100%, исключение составлял уровень резистентности к амикацину (табл. 1).

Результаты обнаружения детерминант резистентности к бета-лактамам антибиотикам показали, что гены молекулярного класса A: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} обнаружены у 63 изолятов *K. pneumoniae* (96,9%), выделенных из мокроты, при этом 27 из них (41,5%) несли сразу три гена. Карбапенемазой КРС обладали 55 штаммов (84,6%). Почти у половины исследованных изолятов – 47,7% ($n = 31$) найдены оксациллины, и около трети обладали генами металло-бета-лактамаз – 35,4% ($n = 23$). Следует отметить, что 24 штамма (36,9%) обладали генами *bla*_{KPC} и *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} в различном сочетании. Комбинация детерминант резистент-

Таблица 1. Резистентность к антимикробным препаратам *K. pneumoniae*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей в монокультуре и ассоциациях, %

Table 1. Resistance to antimicrobial drugs of *K. pneumoniae* isolated from lower respiratory tract secretions in monoculture and associations, %

Антибиотик / Antibiotic	Ассоцианты изолятов <i>K. pneumoniae</i> / Associates of <i>K. pneumoniae</i> isolates			
	моно / mono $n = 9$ / %	<i>A. baumannii</i> $n = 14$ / %	<i>E. faecium</i> $n = 9$ / %	<i>S. haemolyticus</i> $n = 7$ / %
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	6 / 66,7	14 / 100,0	9 / 100,0	7 / 100,0
Амикацин / Amikacin	5 / 55,5	8 / 57,1	8 / 88,9	6 / 80,0
Цефотаксим / Cefotaxime	7 / 77,8	14 / 100,0	9 / 100,0	7 / 100,0
Цефтазидим / Ceftazidime	7 / 77,8	14 / 100,0	9 / 100,0	7 / 100,0
Амоксиклав / Amoksiklav	7 / 77,8	14 / 100,0	9 / 100,0	7 / 100,0
Имипенем / Imipenem	6 / 66,7	13 / 92,8	9 / 100,0	6 / 80,0
Меропенем / Meropenem	6 / 66,7	13 / 92,8	9 / 100,0	6 / 80,0

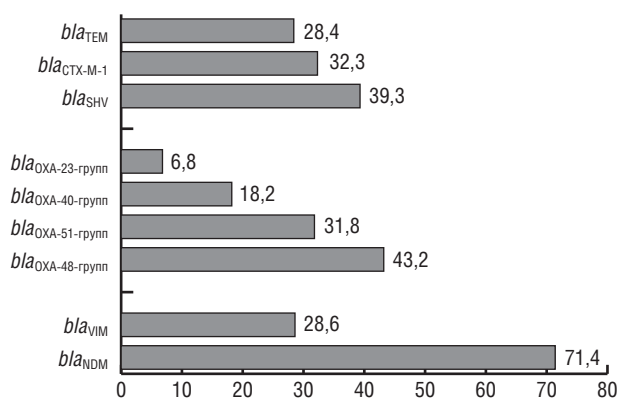


Рис. 1. Частота выявления генов бета-лактамаз *K. pneumoniae*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей, %.
Fig. 1. Frequency of detection of *K. pneumoniae* beta-lactamase genes isolated from lower respiratory tract secretions, %.

ности серинового класса A, включая *bla*_{KPC} и оксациллиназу *bla*_{OXA-48-like}, выявлена у 13,8% изолятов. Три группы бета-лактамаз (A, B, D) обладали 11% исследованных изолятов.

При рассмотрении структуры генов внутри классов бета-лактамаз отмечено, что статистически значимо чаще у изолятов из мокроты обнаружены гены *bla*_{OXA-48-like}, чем *bla*_{OXA-23-like} ($p = 0,0001$) и *bla*_{NDM}, в сравнении с *bla*_{VIM} ($p = 0,01$) (рис. 1).

У изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из мокроты и находящихся в монокультуре, частота обнаружения детерминант резистентности класса A *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV} составляла от 33,0 до 89,0%. Карбапенемаза *bla*_{KPC} выявлена у 100% изолятов, в сочетании со штаммами *S. haemolyticus* процент обнаружения данных детерминант резистентности составил от 60,0% до 100%. Штаммы *K. pneumoniae*, находящиеся в ассоциации с *A. baumannii*, обладали геном *bla*_{SHV} в 100% случаев, *bla*_{TEM} – 70%, *bla*_{KPC} – 93%. Изоляты в сочетании с *E. faecium* реже обладали геном *bla*_{CTX-M-1} (22,2%), *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} и *bla*_{KPC} определены с частотой от 66,7 до 88,9% случаев (табл. 2).

Среди оксациллиназ преобладали *bla*_{OXA-48-like} и *bla*_{OXA-51-like}, максимальная частота их обнаружения (60,0%) регистрировалась у *K. pneumoniae* в ассоциации со *S. haemolyticus*, что

почти в 3 раза чаще в сравнении с изолятами, находящимися в монокультуре и в сочетании с *E. faecium*. Из металло-бета-лактамаз у изолятов *K. pneumoniae* в монокультуре обнаружен только ген *bla*_{NDM}, который выявлен более чем у половины штаммов в ассоциации с *E. faecium*. Металло-бета-лактамазы *bla*_{NDM} и *bla*_{VIM} обнаружены у изолятов в сочетании со *S. haemolyticus* в равных долях.

Из 65 штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из мокроты, только 5 имели фенотипическое проявление бета-лактамаз расширенного спектра. Данные изоляты были чувствительны к карбапенемам. Один штамм находился в монокультуре и нес в себе гены *bla*_{SHV} и *bla*_{KPC}. Остальные находились в ассоциации с *Candida* spp. и *A. baumannii*. Все штаммы обладали генами бета-лактамаз класса A: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} в различных сочетаниях, включая карбапенемазу *bla*_{KPC}, что объясняет резистентность к цефотаксиму, цефтазидиму и амоксиклаву.

Фенотипическую резистентность к карбапенемам проявляли более чем 75% изолятов *K. pneumoniae*, несущих гены приобретенных карбапенемаз: *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like} и *bla*_{NDM}, выявленных из мокроты и находящихся в сочетании с другими бактериальными патогенами.

Изоляты *K. pneumoniae*, выделенные из ткани легкого, находились в ассоциациях с другими бактериальными патогенами в два раза реже по сравнению с изолированными из мокроты (37,0%). При этом доля резистентных к антимикробным препаратам штаммов *K. pneumoniae* в монокультуре была незначительно выше, чем у изолятов, полученных из отделяемого нижних дыхательных путей, и составила от 73,7% до 94,7%, за исключением амикацина (табл. 3).

Все штаммы *K. pneumoniae*, находящиеся в ассоциациях с *A. baumannii* и *E. faecium*, были резистентны к ципрофлоксацину, цефотаксиму, цефтазидиму и карбапенемам.

Детерминанты резистентности сериновых бета-лактамаз молекулярного класса A – *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} – обнаружены у 83,3% всех проанализированных изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из ткани легкого. Сочетание генов типа *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV} и *bla*_{TEM} в одном изоляте *K. pneumoniae* выявлено в 33,3% случаев. Статистически значимо реже

Таблица 2. Детерминанты резистентности к бета-лактамазам изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из отделяемого нижних дыхательных путей в монокультуре и ассоциациях
Table 2. Determinants of resistance to beta-lactamases in *K. pneumoniae* isolates isolated from lower respiratory tract secretions in monoculture and associations

Детерминанты резистентности / Determinants of resistance	Ассоцианты изолятов <i>K. pneumoniae</i> / Associates of <i>K. pneumoniae</i> isolates			
	МОНО / mono n = 9 / %	<i>A. baumannii</i> n = 14 / %	<i>E. faecium</i> n = 9 / %	<i>S. haemolyticus</i> n = 7 / %
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	3 / 33,3	5 / 35,7	2 / 22,2	6 / 60,0
<i>bla</i> _{TEM}	6 / 66,7	10 / 71,4	6 / 66,7	5 / 100,0
<i>bla</i> _{SHV}	8 / 88,9	14 / 100	8 / 88,9	4 / 80,0
<i>bla</i> _{GES}	0	0	0	0
<i>bla</i> _{KPC}	9 / 100,0	13 / 92,8	8 / 88,9	4 / 80,0
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	0	3 / 21,4	1 / 11,1	0
<i>bla</i> _{OXA-40-like}	1 / 11,1	2 / 14,3	1 / 11,1	1 / 20,0
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	2 / 22,2	6 / 42,8	1 / 11,1	3 / 60,0
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	2 / 22,2	5 / 35,7	2 / 22,2	3 / 60,0
<i>bla</i> _{IMP}	0	0	0	0
<i>bla</i> _{VIM}	0	0	2 / 22,2	2 / 40,0
<i>bla</i> _{NDM}	1 / 11,1	2 / 14,3	5 / 55,5	2 / 40,0

Таблица 3. Резистентность к антимикробным препаратам изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из ткани легкого
Table 3. Antimicrobial resistance of *K. pneumoniae* isolates isolated from lung tissue

Антибиотик / Antibiotic	Ассоцианты изолятов <i>K. pneumoniae</i> / Associates of <i>K. pneumoniae</i> isolates		
	моно / mono n = 19 / %	<i>A. baumannii</i> n = 5 / %	<i>E. faecium</i> n = 5 / %
Ципрофлоксацин / <i>Ciprofloxacin</i>	17 / 89,5	5 / 100,0	5 / 100,0
Амикацин / <i>Amikacin</i>	8 / 42,1	4 / 80,0	4 / 80,0
Цефотаксим / <i>Cefotaxime</i>	17 / 89,5	5 / 100,0	5 / 100,0
Цефтазидим / <i>Ceftazidime</i>	17 / 89,5	5 / 100,0	5 / 100,0
Амоксиклав / <i>Amoksiklav</i>	18 / 94,7	5 / 100,0	5 / 100,0
Имипенем / <i>Imipenem</i>	14 / 73,7	5 / 100,0	5 / 100,0
Меропенем / <i>Meropenem</i>	14 / 73,7	5 / 100,0	5 / 100,0

Таблица 4. Детерминанты резистентности к бета-лактамам антибиотикам изолятов *K. pneumoniae*, полученных из ткани легкого
Table 4. Determinants of resistance to beta-lactam antibiotics of *K. pneumoniae* isolates obtained from lung tissue

Детерминанты резистентности / Determinants of resistance	Ассоцианты изолятов <i>K. pneumoniae</i> / Associates of <i>K. pneumoniae</i> isolates		
	n = 9 / %	<i>A. baumannii</i> n = 5 / %	<i>E. faecium</i> n = 5 / %
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	13 / 68,4	0	2 / 40,0
<i>bla</i> _{TEM}	11 / 57,9	0	2 / 40,0
<i>bla</i> _{SHV}	15 / 78,9	2 / 40,0	4 / 80,0
<i>bla</i> _{GES}	0	0	0
<i>bla</i> _{KPC}	7 / 36,8	2 / 40,0	2 / 40,0
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	2 / 10,5	0	1 / 20,0
<i>bla</i> _{OXA-40-like}	1 / 5,3	0	0
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	7 / 36,8	1 / 20,0	1 / 20,0
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	2 / 6,7	1 / 20,0	1 / 20,0
<i>bla</i> _{IMP}	0	0	0
<i>bla</i> _{VIM}	2 / (10,5)	1 / 20,0	1 / 20,0
<i>bla</i> _{NDM}	4 / (21,0)	0	1 / 20,0

($p = 0,0001$), чем у изолятов из мокроты, определена карбапенемаза *bla*_{KPC} – 33,3%. Оксациллиназами обладали 43,3% изолятов, генами металло-бета-лактамаз – 26,7%.

Комбинации генов сериновых бета-лактамаз, включая *bla*_{KPC}, определены у 33,3% изолятов *K. pneumoniae*. Детерминанты резистентности *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} в сочетании с *bla*_{KPC} и *bla*_{OXA-48-like} обнаружены у 23,3% изолятов, что в 1,7 раза чаще по сравнению с частотой их обнаружения в штаммах из мокроты. Штаммы *K. pneumoniae*, обладающие комплексом генов *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like} и *bla*_{NDM}, составляли 6,7%.

При рассмотрении структуры генов внутри классов отмечено, что статистически значимо чаще у изолятов из мокроты обнаруживались гены *bla*_{OXA-48-like}, чем *bla*_{OXA-40-like} ($p = 0,009$) и *bla*_{OXA-51-like} ($p = 0,03$) (рис. 2). Изоляты *K. pneumoniae*, несущие

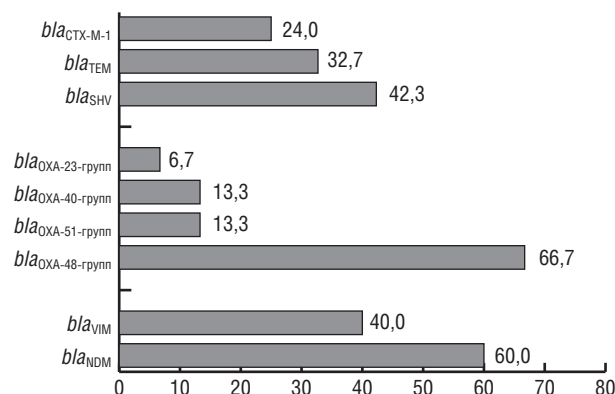


Рис. 2. Частота обнаружения генов *K. pneumoniae*, изолированных из ткани легкого, %.

Fig. 2. Frequency of detection of *K. pneumoniae* genes isolated from lung tissue, %.

в себе гены приобретенных карбапенемаз *bla*_{KPC} и *bla*_{OXA-48-like}, в 100% случаев имели фенотипическое проявление резистентности к имипенему и меропенему.

Гены типа *bla*_{CTX-M-1} у изолятов *K. pneumoniae*, находящихся в монокультуре, определены в 2 раза чаще, чем у изолятов из мокроты. При этом частота обнаружения генов *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV} незначительно ниже. Карбапенемаза *bla*_{KPC} обнаружена статистически значимо реже ($p = 0,001$), чем у изолятов из мокроты. Треть штаммов обладали *bla*_{OXA-48-групп}. Из карбапенемаз обнаружены *bla*_{NDM} и *bla*_{VIM} у 21,0% и 10,5% изолятов соответственно (табл. 4).

Изоляты *K. pneumoniae* в ассоциации с *A. baumannii* не обладали генами *bla*_{CTX-M-1} и *bla*_{TEM}. В сравнении со штаммами из мокроты гены типов *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like} обнаружены в 2 раза реже. Из группы металло-бета-лактамаз класса В гены *bla*_{VIM} обнаружены у 20,0% изолятов.

Детерминанты резистентности серинового класса А типа *bla*_{CTX-M-1} в 2 раза чаще встречались у изолятов *K. pneumoniae*, находящихся в ассоциации с *E. faecium*, в сравнении с *K. pneumoniae* в монокультуре. При этом карбапенемаза *bla*_{KPC} у данных изолятов обнаруживалась в 2,2 раза реже, а оксациллиназа *bla*_{OXA-48-like} – почти в 2 раза чаще. Изоляты из ткани легкого при обнаружении *bla*_{KPC} и *bla*_{OXA-48-like} проявляли резистентность к карбапенемам в 100% случаев, независимо от нахождения в монокультуре или ассоциации.

По многочисленным данным, резистентность внутрибольничных изолятов *K. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам и карбапенемам широко распространена [12–15]. В большинстве случаев их устойчивость связана с наличием генов сериновых бета-лактамаз, а также *bla*_{OXA-48-like}, карбапенемаз *bla*_{KPC} и металло-бета-лактамаз *bla*_{NDM} [17–21].

Инфекции, обусловленные мультирезистентными или продуцирующими карбапенемазы штаммами *K. pneumoniae*, существенно осложняют лечение и ассоциируются с высокой смертностью пациентов [22, 23].

Заключение

Впервые показан генотипический профиль резистентности штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из образцов мокроты, в зависимости от наличия бактериальных ассоциантов и сопоставлен с патогенами аутопсийного материала

в определенный промежуток времени. Установлен высокий уровень множественной устойчивости к антибиотикам изолятов, находящихся в ассоциациях с другими бактериальными патогенами. Резистентность к бета-лактамам антибиотикам и карбапенемам изолятов *K. pneumoniae* обусловлена присутствием генов сериновых бета-лактамаз, включая *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51-like} и металло-бета-лактамазы *bla*_{NDM}. При этом отмечен более широкий спектр детерминант резистентности у *K. pneumoniae*, находящихся в ассоциациях с другими бактериальными патогенами, что необходимо учитывать при подборе антимикробной терапии.

Обнаружение в аутопсийном материале штаммов *K. pneumoniae* в монокультуре, обладающих генами бета-лактамаз с проявлением высокого уровня множественной резистентности к антимикробным препаратам, свидетельствует об этиологической значимости данного патогена в развитии воспалительного процесса.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования в рамках научно-исследовательской работы № АААА-А16-116022610092-8.

Financial support

The work was carried out within the framework of budget funding within the framework of research work No. АААА-А16-116022610092-8.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Алексеева АЕ, Бруснигина НФ, Гординская НА. Молекулярно-генетическая характеристика карбапенем-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae* KP2 как представителя эволюционной ветки высоковирулентных штаммов. Инфекция и иммунитет. 2021;11(3):506-516. DOI: 10.15789/2220-7619-MGC-1480
2. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020 Jun;18(6):344-359. DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1
3. Muraya A, Kyany'a C, Kiyaga S, Smith HJ, Kibet C, Martin MJ, et al. Antimicrobial Resistance and Virulence Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Kenya by Whole-Genome Sequencing. Pathogens. 2022 May 5;11(5):545. DOI: 10.3390/pathogens11050545
4. Тапальский ДВ, Карпова ЕВ, Акуленок ОМ, Окулич ВК, Генералов ИИ, Лескова НЮ, и др. Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* на фоне пандемии COVID-19: опыт многопрофильного стационара. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021;10(3):15-22. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22
5. Spadar A, Perdigão J, Campino S, Clark TG. Large-scale genomic analysis of global *Klebsiella pneumoniae* plasmids reveals multiple simultaneous clusters of carbapenem-resistant hypervirulent strains. Genome Med. 2023 Jan 19;15(1):3. DOI: 10.1186/s13073-023-01153-y
6. Ahmed M, Yang Y, Yang Y, Yan B, Chen G, Hassan RM, et al. Emergence of Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Cohabiting a bla_{NDM}-1-Carrying Virulent Plasmid and a bla_{KPC}-2-Carrying Plasmid in an Egyptian Hospital. mSphere. 2021 May 19;6(3):e00088-21. DOI: 10.1128/mSphere.00088-21
7. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Mar;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12
8. Zhu J, Jiang X, Zhao L, Li M. An Outbreak of ST859-K19 Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Teaching Hospital. mSystems. 2022 Jun 28;7(3):e0129721. DOI: 10.1128/msystems.01297-21
9. Бондаренко АП, Шмыленко ВА, Троценко ОЕ, Зайцева ТА, Караванская ТН, Присяжнюк ЕН, и др. Эпидемиологическая оценка инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, выявленных в акушерском стационаре Хабаровска. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2020;2:15-24. DOI: 10.18565/epidem.2020.10.2.15-24
10. Агеев ВА, Агеев ИВ, Сидоренко СВ. Конвергенция множественной резистентности и гипerviрулентности у *Klebsiella pneumoniae*. Инфекция и иммунитет. 2022;12(3):450-460. DOI: 10.15789/2220-7619-COM-1825
11. Чеботарь ИВ, Бочарова ЮА, Подопригора ИВ, Шагин ДА. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmac.2020.1.4-19
12. Новикова ИЕ, Садеева ЗЗ, Алябьева НМ, Самойлова ЕА, Карасева ОВ, Янюшкина ОГ, и др. Антибиотикорезистентность и вирулентность карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в реанимационных и хирургических отделениях. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023;100(4):321-332. DOI: 10.36233/0372-9311-373
13. Атакишизаде СА. Способность *Klebsiella pneumoniae*, выделенной при внутрибольничных инфекциях, к синтезу β-лактамаз. Детские инфекции. 2019;18(1):60-62. DOI: 10.22627/2072-8107-2019-18-1-60-62
14. Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyle L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. J Med Microbiol. 2020 Feb;69(2):176-194. DOI: 10.1099/jmm.0.001141
15. Yonekawa S, Mizuno T, Nakano R, Nakano A, Suzuki Y, Asada T, et al. Molecular and epidemiological characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Japan. mSphere. 2020;5(5):e00490-20. DOI: 10.1128/msphere.00490-20
16. Xu M, Fu Y, Kong H, Chen X, Chen Y, Li L, et al. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of bla_{KPC}, virulence factors and their impacts on clinical outcome. BMC Infect Dis. 2018 Jul 31;18(1):358. DOI: 10.1186/s12879-018-3263-x
17. Садеева ЗЗ, Новикова ИЕ, Лазарева АВ, Алябьева НМ, Карасева ОВ, Янюшкина ОГ, и др. Бактериемии и инфекции ЦНС у детей, ассоциированные с *Klebsiella pneumoniae*: молекулярно-генетическая характеристика и клинические особенности. Инфекция и иммунитет. 2023;13(6):1117-1128. DOI: 10.15789/2220-7619-PBA-14482
18. Mairi A, Pantel A, Ousaleh F, Sotto A, Touati A, Lavigne JP. OXA-48-producing Enterobacterales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits. J Antimicrob Chemother. 2019 Jul 1;74(7):1848-1855. DOI: 10.1093/jac/dkz146
19. Божкова СА, Гордина ЕМ, Шнейдер ОВ, Рукина АН, Шабанова ВВ. Резистентность продуцирующих карбапенемазы штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(1):47-52. DOI: 10.36488/cmac.2020.1.47-52
20. Бардашева АВ, Фоменко НВ, Калымбетова ТВ, Бабкин ИВ, Кретьен СО, Жираковская ЕВ, и др. Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(2):234-245. DOI: 10.18699/VJ21.49-0
21. Устюжанин АВ, Чистякова ГН, Ремизова ИИ, Маханёк АА. Распространенность генов антибиотикорезистентности *bla*-CTX-M, *bla*-SHV, *bla*-TEM в штаммах энтеробактерий, выделенных от пациентов перинатального центра. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(3):44-49. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-3-44-49
22. Кузнецова МВ, Сергеев ВИ, Михайловская ВС, Кудрявцева ЛГ, Пегушина ОГ. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолятов

Klebsiella pneumoniae, выделенных в условиях кардиохирургического стационара. Инфекция и иммунитет. 2024;14(1):103-114. DOI: 10.15789/2220-7619-MAM-15631

23. Воронина ОЛ, Кунда МС, Рыжова НН, Аксенова ЕИ, Садеева ЗЗ, Новикова ИЕ, и др. Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023;100(6):399-409. DOI: 10.36233/0372-9311-430

References

- Alekseeva AE, Brusnigina NF, Gordinskaya NA. Molecular genetic characteristics of the carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* KP254 strain as a representative of the highly virulent strain evolutionary branch. Russian Journal of Infection and Immunity. 2021;11(3):506-516. DOI: 10.15789/2220-7619-MGC-1480 (In Russian).
- Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020 Jun;18(6):344-359. DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1
- Muraya A, Kyany'a C, Kiyaga S, Smith HJ, Kibet C, Martin MJ, et al. Antimicrobial Resistance and Virulence Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Kenya by Whole-Genome Sequencing. Pathogens. 2022 May 5;11(5):545. DOI: 10.3390/pathogens11050545
- Tapalsky DV, Karpova EV, Akulenok OM, Akulich VK, Generalov I, Leskova NU, et al. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the background of the COVID-19 pandemic: the experience of a multidisciplinary hospital. Infectious diseases: news, opinions, training. 2021;10(3):15-22. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22 (In Russian).
- Spadar A, Perdigão J, Campino S, Clark TG. Large-scale genomic analysis of global *Klebsiella pneumoniae* plasmids reveals multiple simultaneous clusters of carbapenem-resistant hypervirulent strains. Genome Med. 2023 Jan 19;15(1):3. DOI: 10.1186/s13073-023-01153-y
- Ahmed M, Yang Y, Yang Y, Yan B, Chen G, Hassan RM, et al. Emergence of Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Cohabiting a blaNDM-1-Carrying Virulent Plasmid and a blaKPC-2-Carrying Plasmid in an Egyptian Hospital. mSphere. 2021 May 19;6(3):e00088-21. DOI: 10.1128/mSphere.00088-21
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Mar;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12
- Zhu J, Jiang X, Zhao L, Li M. An Outbreak of ST859-K19 Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Teaching Hospital. mSystems. 2022 Jun 28;7(3):e0129721. DOI: 10.1128/msystems.01297-21
- Bondarenko AP, Shmylenko VA, Trotsenko OE, Zaitseva TA, Karavyanskaya TN, Prisyazhnyuk EN, et al. Epidemiological assessment of infections related to the provision of medical care identified in the obstetric hospital of Khabarovsk. Epidemiology and infectious diseases. 2020;2:15-24. DOI: 10.18565/epidem.2020.10.2.15-24 (In Russian).
- Ageevets VA, Ageevets IV, Sidorenko SV. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. Russian Journal of Infection and Immunity. 2022;12(3):450-460. DOI: 10.15789/2220-7619-COM-1825 (In Russian).
- Chebota IV, Bocharova YuA, Podoprigrora IV, Shagin DA. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19 (In Russian).
- Novikova IE, Sadeeva ZZ, Alyabieva NM, Samoylova EA, Karaseva OV, Yanyushkina OG, et al. Antimicrobial resistance and virulence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children in intensive care and surgical units. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2023;100(4):321-332. DOI: 10.36233/0372-9311-373 (In Russian).
- Atakishizade SA. The ability of *Klebsiella pneumoniae* isolated from nosocomial infections to synthesize β -lactamases. Childhood infections. 2019;18(1):60-62. DOI: 10.22627/2072-8107-2019-18-1-60-62 (In Russian).
- Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyle L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. J Med Microbiol. 2020 Feb;69(2):176-194. DOI: 10.1099/jmm.0.001141
- Yonekawa S, Mizuno T, Nakano R, Nakano A, Suzuki Y, Asada T, et al. Molecular and epi demiological characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Japan. mSphere.2020;5(5):e00490-20. DOI: 10.1128/msphere.00490-20
- Xu M, Fu Y, Kong H, Chen X, Chen Y, Li L, et al. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of blaKPC, virulence factors and their impacts on clinical outcome. BMC Infect Dis. 2018 Jul 31;18(1):358. DOI: 10.1186/s12879-018-3263-x
- Sadeeva ZZ, Novikova IE, Lazareva AV, Alyabyeva NM, Karaseva OV, Yanushkina OG, et al. Pediatric bacteremia and CNS infections associated with *Klebsiella pneumoniae*: molecular genetic characteristics and clinical features. Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet). 2023;13(6):1117-1128. DOI: 10.15789/2220-7619-PBA-14482 (In Russian).
- Mairi A, Pantel A, Ousaleh F, Sotto A, Touati A, Lavigne JP. OXA-48-producing Enterobacterales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits. J Antimicrob Chemother. 2019 Jul 1;74(7):1848-1855. DOI: 10.1093/jac/dkz146
- Bozhkova SA, Gordina EM, Schneider OV, Rukina AN, Shabanova V. Resistance of carbapenemase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with orthopedic infection. Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. 2020;22(1):47-52. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.47-52 (In Russian).
- Bardasheva AV, Fomenko NV, Kalymbetova TV, Babkin IV, Chretien SO, Zhirakovskaya EV, et al. Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2021;25(2):234-245. DOI: 10.18699/VJ21.49-o (In Russian).
- Ustyuzhanin AV, Chistyakova GN, Remizova II, Mahanek AA. Prevalence of antibiotic resistance genes *bla*-CTX-M, *bla*-SHV, *bla*-TEM in enterobacteria strains isolated from patients of the perinatal center. Epidemiology and Vaccine prevention. 2022;21(3):44-49. DOI:10.31631/2073-3046-2022-21-3-44-49 (In Russian).
- Kuznetsova MV, Sergevni VI, Mihailovskaya VS, Kudryavtseva LG, Pegyshina OG. Microbiological and molecular genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates, extracted under conditions of cardiac surgery hospital. Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet). 2024;14(1):103-114. DOI: 10.15789/2220-7619-MAM-15631 (In Russian).
- Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Akseanova EI, Sadeeva ZZ, Novikova IE, et al. Genomic features of resistant *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of pediatric hospital patients. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2023;100(6):399-409. DOI: 10.36233/0372-9311-430 (In Russian).

Информация о соавторах:

Катаева Любовь Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, заведующий бактериологической лабораторией ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-9966-8454

Степанова Татьяна Федоровна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-6289-6274

Information about co-authors:

Lyubov V. Kataeva, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, head of the bacteriological laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute
ORCID: 0000-0001-9966-8454

Tatiana F. Stepanova, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Researcher, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute
ORCID: 0000-0002-6289-6274

Аллельные варианты локусов гена *p66* у изолятов от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев возбудителя иксодового клещевого боррелиоза *Borrelia bavariensis*, циркулирующего в природных очагах среднего Урала

К.А.Голидонова¹, Э.И.Коренберг¹, Ю.В.Ковалевский¹, Н.Б.Горелова¹, В.А.Матросова²

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН, Москва, Российская Федерация

Секвенированием методом полимеразной цепной реакции исследованы нуклеотидные последовательности локуса гена *p66* у 88 изолятов *Borrelia bavariensis*, выделенных от мелких млекопитающих 8 видов из природного очага, расположенного в Пермском крае России. Обнаружено 11 аллельных вариантов гена *p66*, отличающихся несинонимичными заменами нуклеотидных последовательностей в секвенированных локусах. Большинство вариантов выявлено у основного в этом регионе резервуарного хозяина боррелий – рыжей полевки (*Myodes glareolus*) и полевки-экономки (*Alexandromys oeconomicus*). Два из них оказались идентичными изолятам, полученным ранее от людей, больных иксодовым клещевым боррелиозом. Мелкие млекопитающие имеют решающее значение в сохранении генетической гетерогенности популяции *B. bavariensis* в периоды сезонной резервации эпизоотического процесса, включая циркуляцию аллельных вариантов, встречающихся у инфицированных людей и способствующих адгезии возбудителя.

Ключевые слова: *Borrelia bavariensis*, ген *p66*, аллельные варианты, мелкие млекопитающие, эпизоотический процесс

Для цитирования: Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Горелова Н.Б., Матросова В.А. Аллельные варианты локусов гена *p66* у изолятов от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев возбудителя иксодового клещевого боррелиоза *Borrelia bavariensis*, циркулирующего в природных очагах среднего Урала. Бактериология. 2025; 10(1): 50–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-50-57

Allelic variants of the *p66* gene loci in isolates from small mammals – reservoir hosts of the tick-borne borreliosis agent *Borrelia bavariensis* circulating in natural foci of the middle Urals

K.A.Golidonova¹, E.I.Korenberg¹, Yu.V.Kovalevskii¹, N.B.Gorelova¹, V.A.Matrosova²

¹N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

The nucleotide sequences of the *p66* gene locus in 88 *Borrelia bavariensis* isolates from small mammals of eight species from a natural focus located in the Perm region of Russia were analyzed by PCR-sequence analysis. Eleven allelic variants of the *p66* gene were detected, differing by nonsynonymous nucleotide sequence substitutions at sequenced loci. The majority of variants were detected in the main reservoir hosts of *Borrelia* in this region – the bank vole (*Myodes glareolus*) and the root vole (*Alexandromys oeconomicus*). Two of these variants were found to be identical to isolates obtained previously from humans with ixodid tick-borne borrelioses. Small mammals are crucial in maintaining the genetic heterogeneity of the *B. bavariensis* population during periods of seasonal quiescence of the epizootic process, including the circulation of allelic variants found in infected humans and contributing to the adhesion of the pathogen.

Key words: *Borrelia bavariensis*, *p66* gene, allelic variants, small mammals, epizootic process

Для корреспонденции:

Голидонова Кристина Андреевна, научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Статья поступила 19.08.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Kristina A. Golidonova, Researcher of Laboratory of Infection Vectors, N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 18 Gamaleya str., Moscow, 123098, Russian Federation

The article was received 19.08.2024, accepted for publication 31.03.2025

For citation: Golidonova K.A., Korenberg E.I., Kovalevskii Yu.V., Gorelova N.B., Matrosova V.A. Allelic variants of the *p66* gene loci in isolates from small mammals – reservoir hosts of the tick-borne borreliosis agent *Borrelia bavariensis* circulating in natural foci of the middle Urals. Bacteriology. 2025; 10(1): 50–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-50-57

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – группа этиологически самостоятельных хронических или рецидивирующих спирохетозных природноочаговых облигатно-трансмиссивных инфекций, возбудители которых передаются иксодовыми клещами [1]. Эти возбудители входят в комплекс спирохет *Borrelia burgdorferi* sensu lato, который включает более 22 видов. Патогенность для человека пока доказана только для *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii* и *B. mayonii* [2]. В России выявлены природные очаги всех перечисленных видов боррелий, за исключением *B. mayonii*. Наибольшее эпидемическое значение имеют *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. bavariensis* [1, 3–5]. В Евразии эти боррелии формируют сложные трехчленные паразитарные системы, неразрывно связанные с жизненными схемами таежного (*Ixodes persulcatus*) и европейского лесного (*I. ricinus*) клещей. Существование клещей невозможно без их прокормителей, которые в той или иной степени выполняют роль резервуарных хозяев боррелий. Мелкие млекопитающие – основные хозяева предимагинальных фаз развития этих клещей, причем наибольшее значение имеют лесные полевки родов *Myodes* и *Craneomys*, а также землеройки бурозубки рода *Sorex* [6–8]. При выделении изолята для его номенклатуры были использованы первые буквы родового латинского названия животного-источника по И.М.Громову и др. [9], сохраняющиеся в музее боррелий и международном GenBank NCBI (см. далее). Здесь и далее в тексте статьи изменившиеся русские и латинские, а также английские названия мелких млекопитающих приведены в скобках по А.А.Лисовскому [10].

B. bavariensis описана как самостоятельный вид сравнительно недавно. К нему отнесены боррелии, считавшиеся ранее генетической подгруппой NT29 *B. garinii*, которая распространена в природных очагах Евразии [3, 11, 12]. Факторы

патогенности *B. bavariensis*, как и других возбудителей ИКБ, – поверхностные белки мембраны бактерии [13]. Инфекционный процесс «запускается» адгезией боррелий к клеткам млекопитающих. Для начала этого процесса большое значение имеет белок P66, контролируемый одноименным геном [14–16].

В Пермском крае заражения ИКБ, как правило, происходят в результате укуса человека голодным инфицированным имаго клеща *I. persulcatus* – единственным источником возбудителей [17]. От пациентов в остром периоде заболевания были выделены изоляты *B. bavariensis* с тремя вариантами нуклеотидных и аминокислотных последовательностей локуса гена *p66* [18].

Цель исследования – выяснение роли мелких млекопитающих, резервуарных хозяев *B. bavariensis*, в поддержании циркуляции в природном очаге различных аллельных вариантов гена *p66*, кодирующего соответствующий белок этого возбудителя, включая варианты, выявленные у пациентов, больных ИКБ.

Материалы и методы

Исследовано 88 изолятов боррелий из Государственной коллекции микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней человека II–IV групп патогенности («ГКМ Гамалеи», Москва). Они получены в 1992–2003 гг. от мелких млекопитающих 8 видов (табл. 1) в природном очаге ИКБ в стационаре (58.32° с.ш., 57.43° в.д.) в горно-таежных лесах Чусовского района Пермского края. Указанный период времени охватывал 4 цикла динамики численности зверьков. По результатам первичной идентификации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)/полиморфизма длины рестрикционных фрагментов межгенного спейсера *rrfA-rrlB* они

Таблица 1. Количество исследованных изолятов от мелких млекопитающих разных видов и их распределение по аллельным вариантам локуса гена *p66*

Table 1. Number of studied isolates from small mammals of different species and their distribution by allelic variants of *p66* gene locus

Вид млекопитающего и буквенное обозначение изолятов* / Mammal species and letter designation of isolates	Исследовано изолятов / Isolates analysed	Из них число каждого из 11 выявленных вариантов с порядковым номером фрагмента белка P66 / Of these, the number of each of the 11 identified variants with the sequence number of P66 protein fragment											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Рыжая полевка / Bank vole (<i>Myodes glareolus</i>) – Cg	59	29	13	–	2	5	3	2	2	1	1	1	
Полевка-экономка / Root vole (<i>Alexandromys oeconomus</i>) – Mo	14	5	4	–	3	–	–	2	–	–	–	–	–
Красная полевка / Northern red-backed vole (<i>Myodes rutilus</i>) – Crt	7	1	1	–	3	–	2	–	–	–	–	–	–
Красно-серая полевка / Grey red-backed vole (<i>Craneomys rufocanus</i>) – Crf	2	–	–	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–
Лесная мышовка / Northern birch mouse (<i>Sicista betulina</i>) – Sb	2	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Обыкновенная бурозубка / Common shrew (<i>Sorex araneus</i>) – Sa	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Темная полевка / Field vole (<i>Agricola agrestis</i>) – Ma	1	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–
Малая лесная мышь / Herb wood mouse (<i>Sylvemus uralensis</i>) – Au	1	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
Всего / Total	88	37	19	0	9	5	5	5	4	1	1	1	1

*См. примечание к разделу «Введение». После латинского названия указаны буквы в обозначениях изолятов.

See note to the Introduction section. The Latin name is followed by the letters in the isolate designations.

были отнесены к *B. garinii* евразийской подгруппы NT29 [19]. Выборочная реидентификация методами мультилокусного сиквенс-анализа и типирования показала их принадлежность к виду *B. bavariensis* [3]. В исследованных экосистемах также циркулируют *B. afzelii* и *B. garinii*. Из 229 идентифицированных изолятов боррелий, полученных всего от мелких млекопитающих, почти 43% составили моно- и микст-культуры с *B. bavariensis* [20].

Мелких млекопитающих отлавливали живоловками в июле-августе, в период наибольшей сезонной инфицированности [21]. Их эвтаназию проводили диэтиловым эфиром в соответствии с нормативным документом времени отлова зверьков. Возраст полевок определяли по степени стертости зубов по критериям Н.В.Тупиковой и соавт. [22]. Изоляция боррелий посевом на среду BSK проб из мочевого пузыря и биоптатов кожи ушей зверьков, а также культивирование посевов описаны ранее [21]. Частота встречаемости вариантов структуры локуса гена *p66* среди изолятов *B. bavariensis*, полученных посевом биоптатов ушной кожи и проб из мочевых пузырей зверьков, достоверно не отличалась ($t = 0,04$, $t < 2,0$).

Выделение ДНК бактерий проведено коммерческим набором ПРОБА-НК «ДНК-технология» (Россия). ПЦР выполнена в объеме 30 мкл, содержащем 1 единицу Taq-полимеразы, 1х ПЦР-буфер с $MgCl_2$, 0,2 мкМ дНТФ, 3 мкл ДНК, деионизированную воду и по 0,2 мкМ праймеров: 5'-GAAATCTCAAGCTATGAAGAC-3' (прямой) и 5'-STACATATGCTTCTGTTGAAATGG-3' (обратный) [18]. Они фланкировали 280 п.н. локуса хромосомного гена *p66*, кодирующего одну из поверхностных петель белка Р66 [23]. ПЦР проведена в амплификаторе Mastercycler nexus Eppendorf (Германия). Реакционная смесь нагревалась до 94°C в течение 1 мин, далее подвергалась 30 циклам денатурации в течение 30 с при 94°C, отжигу в течение 30 с при 53°C, элонгации в течение 30 с при 72°C. Финальная элонгация проведена при той же температуре в течение 5 мин. ПЦР-продукты очищали коммерческим набором HiPureGel DNA MiniKit Magen (Китай).

Ампликоны секвенированы с использованием набора реактивов ABI PRISM Big Dye Terminator v.3.1 и последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI 3500xL DNA Analyser Applied Biosystems (США) в Центре коллективного пользования «Геном» (ИМБ РАН, Москва). Результаты проанализированы с использованием сервиса BLAST, программ Chromas, UGENE, MEGA11 и Jalview. Нуклеотидные и аминокислотные выравнивания выполнены методом Muscle. Дендрограмма построена с помощью 3-параметровой эволюционной модели Тамуры методом максимального правдоподобия при величине bootstrap 1000 повторов.

В базу данных GenBank NCBI депонировано 15 нуклеотидных последовательностей локуса гена *p66* (номера доступа OR620166-OR620180).

Статистическая обработка данных выполнена для $p = 0,95$ в программе Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Большинство исследованных изолятов получено от рыжих полевок и полевок-экономок, преобладающих в населении

мелких млекопитающих горно-таежных лесов Пермского края, имеющих важное значение в прокормлении предимагинальных фаз иксодовых клещей и легко передающих им боррелии [8]. Рыжая полевка – один из основных резервуарных хозяев боррелий, широко распространена в лесной зоне России [24, 25]. Зараженность этих полевок боррелиями в изученном очаге составляла 17,6% [26]. Полевка-экономка обычно занимала второе место по вылову. Этот вид прокармливает значительную часть предимагинальных фаз клеща *I. persulcatus*. Полевка-экономка – дополнительный резервуарный хозяин боррелий [21]. Как и рыжая полевка, она распространена в лесной зоне России [7]. Зараженность экономок боррелиями составляла 23,1% [26]. Именно от этих двух видов зверьков получено большинство исследованных культур *B. bavariensis*. Красная, красно-серая полевики и другие, как правило, малочисленные грызуны представлены лишь единичными изолятами этой боррелии (табл. 1).

На исследованной территории значительная доля вылова мелких млекопитающих приходится на обыкновенную бурозубку, которая имеет существенное значение в прокормлении клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*. Однако показатель зараженности *S. araneus* боррелиями составлял не более 4–5% [26], от зверьков этого вида изолированы только 2 культуры *B. bavariensis* (табл. 1). Эти данные, как и работы других авторов [1, 24, 27, 28], свидетельствуют о низкой восприимчивости обыкновенных бурозубок к боррелиям и их слабом участии в поддержании эпизоотического процесса.

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей локусов гена *p66* всех исследованных изолятов *B. bavariensis* от 8 видов мелких млекопитающих выявила 14 ветвей (рис. 1), из которых только 11 образовывали кластеры (т.е. аллельные варианты). Для дальнейшего анализа гетерогенности локусов гена *p66* и вариантов фрагмента белка Р66 в паразитарной системе *B. bavariensis* этим кластерам даны порядковые номера в соответствии с уменьшением числа сходных изолятов. При этом первые три номера сохранены за нуклеотидными последовательностями, выявленными у людей, больных ИКБ, причем третий вариант обнаружен только у 1 изолята от людей с ИКБ [18]. На этой дендрограмме в вариант №1 объединены две ветви, включающие изоляты от Sa-2814 до Hs-10, а также Mo-1165 и Cg-2752, поскольку сходство их нуклеотидных последовательностей локусов гена *p66* составило более 99,5%. Это тоже относится к вариантам №2 и №7 (рис. 1). Нуклеотидные последовательности локуса гена *p66* изолятов Cg-2692 и Sb-3174 отличались больше 1,1%, поэтому они разделяются на варианты №11 и №12 соответственно. Различия между выявленными 11 вариантами достигали 3,2%, а сходство нуклеотидных последовательностей изолятов, сгруппировавшихся в общие кластеры, составило 98,9–100%. Это свидетельствует о гетерогенности структуры гена *p66* *B. bavariensis*, которая выявлена и у патогенных боррелий других видов [29–31]. Почти в половине кластеров оказались изоляты от зверьков нескольких видов. Исключения составили некоторые варианты, представленные единичными изолятами. Приведенные данные подтверждают отсутствие четкой связи определенного варианта локуса гена *p66* с конкретным видом его хозяина. Мелкие млекопитающие разных видов могут быть хозяева-

ми нескольких различных генетических вариантов патогенных боррелий одного вида [20, 32].

Для того чтобы определить, насколько широко распространены выявленные аллельные варианты локуса гена *p66*, проведен анализ их нуклеотидного сходства с последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank. Так, нуклеотидные последовательности изолятов варианта №4

(рис. 1) оказались сходными на 100% с таковыми у изолята BgVir *B. bavariensis*, выделенного от *I. persulcatus* из Томской области. Сиквенсы изолятов варианта №6 были наиболее сходными (99,6%) с последовательностями изолята Prm7019-12 *B. bavariensis*, выделенного от *I. persulcatus* из Пермского края. Вариант №7 идентичен таковым изолята Tom5306 и сходен на 99,6% с изолятом Tom4606 *B. bavariensis*, которые

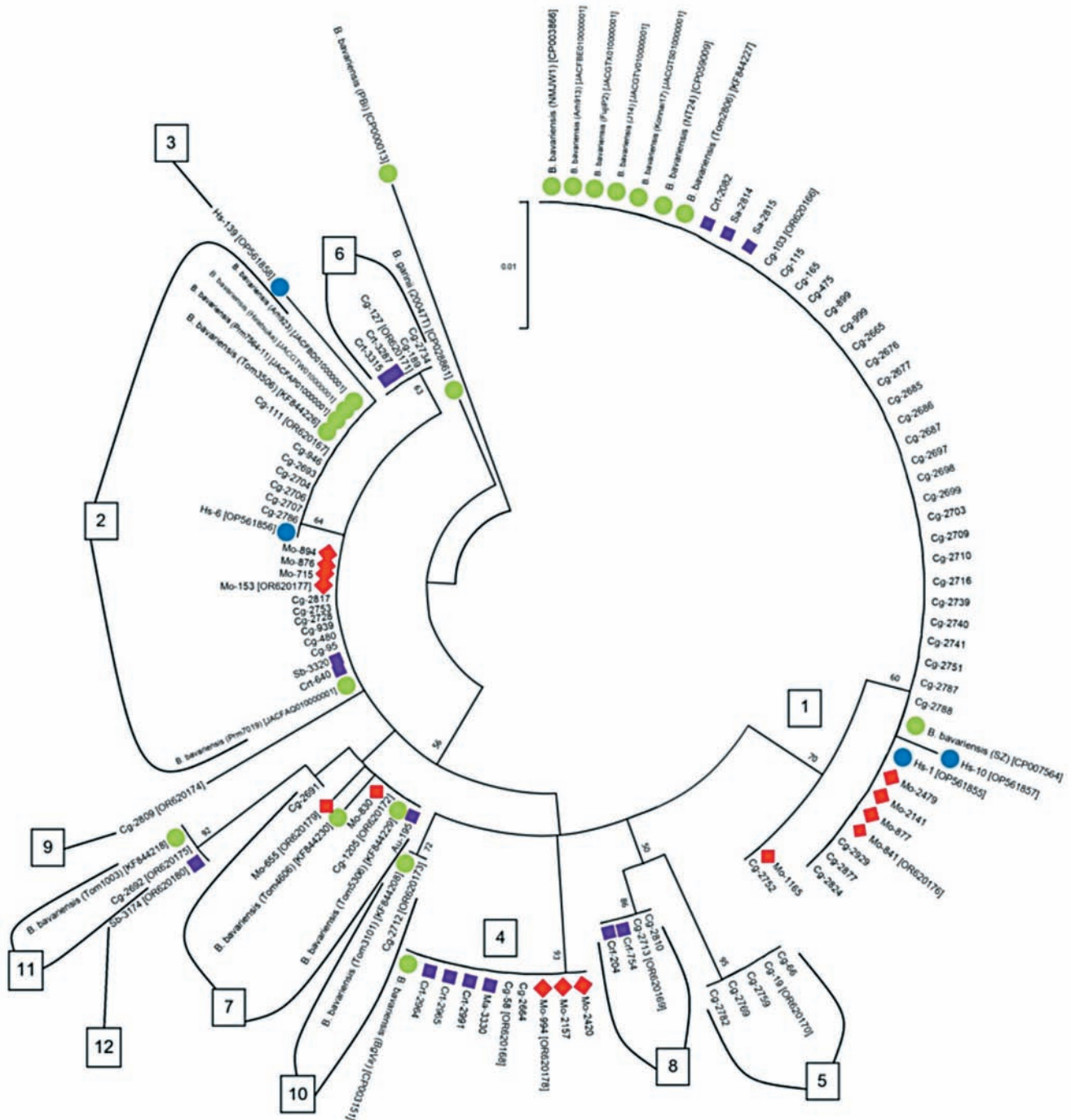


Рис. 1. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей локуса гена *p66* изолятов от мелких млекопитающих различных видов. Изоляты от полевки-экономки обозначены красными ромбами; изоляты от мелких млекопитающих других немногочисленных видов – фиолетовыми квадратами; изоляты от людей с ИКБ – синими кружками; типовые штаммы *B. bavariensis* – зелеными кружками. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках – номера доступа нуклеотидных последовательностей локуса гена *p66* в GenBank.

Fig. 1. Dendrogram of nucleotide sequences of *p66* gene locus of isolates from small mammals of different species. Isolates from the root vole are marked with red rhombuses; isolates from small mammals of other few species are marked with purple squares; isolates from humans with ITBB are marked with blue circles; typical strains of *B. bavariensis* are marked with green circles. In parentheses – names of *Borrelia* strains; in square brackets – access numbers of nucleotide sequences of *p66* gene locus in GenBank.

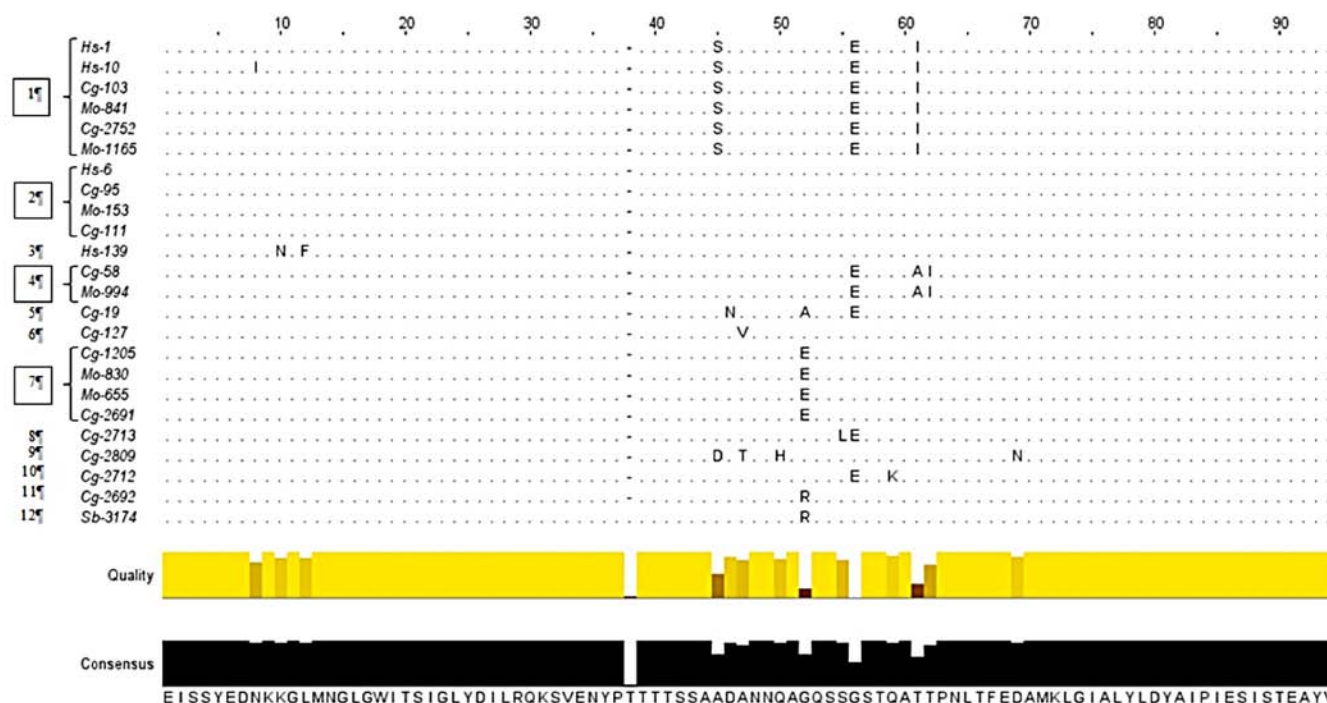


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей у выборочных изолятов от мелких млекопитающих, представляющих все выявленные варианты фрагмента белка Р66. Порядковый номер варианта приведен по вертикали перед номером изолята. Quality – качество выравнивания, consensus – консенсусная последовательность.

Fig. 2. Amino acid sequence alignment of selected isolates from small mammals representing all identified variants of P66 protein fragment. The variant number is given vertically before the isolate number. Quality – quality of alignment, consensus – consensus sequence.

выделены от таежных клещей из Томской области. Нуклеотидные последовательности вариантов №10 и №11 идентичны сиквенсам изолятов Tom3101 и Tom1003 *B. bava-riensis* соответственно, полученных также от таежных клещей Томской области. Следовательно, можно утверждать, что выявленные аллельные варианты локуса гена *r66* у изолятов от мелких млекопитающих достаточно широко распространены в России.

Дендрограмма аминокислотных последовательностей фрагментов белка Р66 у всех изолятов от исследованных мелких млекопитающих различных видов (не приведена в связи с ограничением объема статьи) в целом подтвердила их кластеризацию на рис. 1 и выявила, что из 14 ветвей только 11 оказались с несинонимичными нуклеотидными заменами локусов гена *r66* (табл. 1). Внутри этих кластеров аминокислотные последовательности белка Р66 были идентичны: значительная часть всех изолятов группировалась в 1 и 2 кластеры (37 и 19 из 88 изолятов соответственно). У изолятов от рыжих полевков обнаружено 10 вариантов фрагмента белка Р66; у полевков-экономов – 4. Наиболее часто зверьки этих видов были инфицированы боррелиями с 1-м (38,6 ± 5,2%) и 2-м (19,3 ± 4,2%) вариантами нуклеотидных последовательностей гена *r66* (табл. 1).

Аминокислотное выравнивание выборочных образцов каждого варианта фрагмента белка Р66 (рис. 2) показало, что они отличаются друг от друга по разнообразию и характеру аминокислотных замен. Оно выявило вариативный участок, состоящий из 31 аминокислоты, в котором большая часть замен произошла со сменой полярности определенных аминокислот. Обнаружено, что 1-й и 2-й варианты фрагмента белка Р66 отличаются друг от друга заменами со

сменой полярности аминокислот в позициях 45, 56 и 61. Остальные варианты характеризовались большим количеством аминокислотных замен, многие из которых также произошли со сменой полярности (рис. 2). Такие замены, предположительно, могут влиять на структуру петли белка Р66 и, следовательно, на его функции, включая степень адгезивности боррелий к клеткам человека, что требует отдельного специального изучения.

Исследованные изоляты были получены в годы разной численности зверьков. Во все годы ее динамики среди изолятов от мелких млекопитающих с той или иной частотой обнаружено не менее 5 вариантов фрагмента белка Р66, из которых наиболее часто встречались варианты 1 и 2 (табл. 2). Эти данные позволяют считать, что мелкие млекопитающие даже в годы депрессии их численности способствуют сохранению генетической гетерогенности возбудителя ИКБ в природном очаге. Отсутствие тех или иных вариантов структуры белка Р66 среди изолятов, полученных в определенные годы (табл. 2), объясняется их редкостью, требующей исследования большего числа образцов.

Для мелких млекопитающих, как известно, характерны небольшая индивидуальная продолжительность жизни и быстрая смена поколений в их популяциях. Заражение боррелиями этих резервуарных хозяев обычно приводит к пожизненному хроническому инфекционному процессу, который сопровождается размножением возбудителя [33]. Поэтому среди «старых» перезимовавших зверьков зараженность особей выше, чем среди секолеток [27, 34]. В этой связи мы сравнили доли изолятов с наиболее часто встречающимися вариантами белка Р66 (варианты 1 и 2) среди рыжих полевков установленного возраста, в отношении которых объем наших

Таблица 2. Варианты фрагмента белка Р66 у изолятов от мелких млекопитающих, исследованных в разные годы динамики их численности

Table 2. P66 protein fragment variants in isolates from small mammals examined in different years of population dynamics

Уровень численности мелких млекопитающих в годы изоляции боррелий (по [27]) / Population levels of small mammals during <i>Borrelia</i> isolation years (according to [27])	Исследовано изолятов / Isolates analysed	Из них число каждого из 11 выявленных вариантов с порядковым номером фрагмента белка Р66 / Of these, the number of each of the 11 identified variants with the sequence number of P66 protein fragment										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Высокий (1992, 1995, 1998, 2001) / High	28	9	8	–	5	2	1	2	1	–	–	–
Средний (1994, 1997, 2000, 2003) / Middle	54	27	10	–	4	3	3	2	2	1	1	–
Низкий (1993, 1996, 1999, 2002) / Low	6	1	1	–	–	–	1	1	1	–	–	1

данных позволял произвести соответствующий расчет. Так, из 30 изолятов от полевков-сеголеток 21 (70,0 ± 6,5%) имели один из этих вариантов белка, а 19 изолятов от перезимовывавших «старых» зверьков – 16 (84,2 ± 5,2%). Различия между приведенными показателями недостоверны ($t = 0,17$; $t < 2,0$). Изложенные факты свидетельствуют о том, что перезимовывавшие зараженные мелкие млекопитающие, наряду с личинками и нимфами, инфицировавшимися в предшествующем сезоне, сохраняют паразитарную систему боррелий и их генетическую гетерогенность в природном очаге в период сезонной резервации эпизоотического процесса. Такая функция резервуарных хозяев особенно важна, поскольку трансовариальная передача спирохет группы возбудителей ИКБ от зараженных самок клеща личинкам дочерней генерации не происходит или (в отличие, например, от вируса клещевого энцефалита) наблюдается в редких случаях [1, 28, 35, 36]. Поэтому голодные личинки могут получить боррелии только при паразитировании на мелких млекопитающих, что определяет возможность дальнейшей трансфазовой передачи этих спирохет нимфам.

Наиболее распространенные у изолятов от мелких млекопитающих 1-й и 2-й варианты фрагмента белка Р66 (табл. 1) оказались идентичны таковым двум вариантам у изолятов от людей, больных ИКБ, в Пермском крае. Сравнение их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с таковыми из базы данных GenBank выявило, что эти два варианта были обнаружены у изолятов от людей, больных ИКБ, в Японии, а также у изолятов от клещей *I. persulcatus* в России, Китае и Японии [18]. Это позволяет предполагать, что два аллельных варианта (1-й и 2-й) гена *p66* имеют наибольшее распространение в природных очагах *B. bavariensis* с основным переносчиком таежным клещом и резервуарными хозяевами этих спирохет – мелкими млекопитающими.

Заключение

Результаты исследования показывают, что фоновым видам мелких млекопитающих (за исключением землероек) принадлежит решающее значение в поддержании циркуляции *Borrelia bavariensis* с различными вариантами фрагмента белка Р66, включая 2 доминирующих, обнаруженных ранее у людей, заразившихся ИКБ. В восточно-европейских горно-таежных лесах наиболее важное значение для поддержания генетической гетерогенности возбудителя в природном очаге и ее сохранения в межэпизоотический период имеет рыжая полевка.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Изучение эколого-генетических факторов повышенной патогенности возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов как основа прогнозирования их эпидемической опасности в разработки средств лабораторной диагностики» (121030900383-2). Секвенирование ампликонов частично проведено за счет средств ИМБ РАН.

Financial support

The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation “Study of ecological and genetic factors of increased pathogenicity of ixodid tick-borne borreliosis pathogens as a basis for predicting their epidemic danger in the development of laboratory diagnostic tools” (121030900383-2). Sequencing of amplicons was partially carried out at the expense of the IMB RAS.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Коренберг ЭИ, Помелова ВГ, Осин НС. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Комментарий, 2013.
2. Hunfeld K-P, Gray J. Lyme Borreliosis. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022.
3. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB. Multilocus Sequence Analysis of “Atypical” *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolated in Russia. Mol Gen Mikrobiol Virol. 2017;32:196-203. DOI: 10.3103/S0891416817040073
4. Golidonova KA, Korenberg EI, Gorelova NB, Ginzburg AL. Multilocus Sequence Analysis of Isolates from Patients with the Erythemic Form of Ixodid Tick-Borne Borreliosis. Mol Gen Microbiol Virol. 2021;36:170-175. DOI: 10.3103/S089141682104008X
5. Рудакова СА, Теслова ОЕ, Муталинова НЕ, Пенъевская НА, Блох АИ, Рудаков НВ, и др. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2013–2022 гг. и прогноз на 2023 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;2:75-87. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-75-87
6. Gern L, Humair P. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;149-174. DOI: 10.1079/9780851996325.0149
7. Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YuV. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;175-200. DOI: 10.1079/9780851996325.01

8. Балашов ЮС. Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных. СПб.: Наука, 2009.
9. Громов ИМ. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН, 1995.
10. Лисовский АА (ред.). Млекопитающие России: список видов и прикладные аспекты. М.: Т-во научн. изданий КМК, 2019.
11. Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao WC, Chu C, et al. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Nov;63(Pt 11):4284-4288. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0
12. Margos G, Fingerle V, Reynolds SE. *Borrelia bavariensis*: Vector Switch, Niche Invasion, and Geographical Spread of a Tick-Borne Bacterial Parasite. *Front Ecol Evol.* 2019;7:401. DOI: 10.3389/fevo.2019.00401
13. Samuels DS, Radolf JD. *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Caister Academic Press: Poole, UK, 2010;299-331.
14. Coburn J, Cugini C. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin α v β 3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jun 10;100(12):7301-6. DOI: 10.1073/pnas.1131117100
15. Curtis MW, Fierros CH, Hahn BL, Surdel MC, Kessler J, Anderson PN, et al. Identification of amino acid domains of *Borrelia burgdorferi* P66 that are surface exposed and important for localization, oligomerization, and porin function of the protein. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Sep 23;12:991689. DOI: 10.3389/fcimb.2022.991689
16. Tan X, Castellanos M, Chaconas G. Choreography of Lyme Disease Spirochete Adhesins To Promote Vascular Escape. *Microbiol Spectr.* 2023 Aug 17;11(4):e0125423. DOI: 10.1128/spectrum.01254-23
17. Коренберг ЭИ, Воробьева НН, Сумливая ОН, Фризен ВИ, Афанасьева МВ. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Пермском крае (этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика). Методические рекомендации для врачей. Пермь, 2007.
18. Golidonova K, Korenberg E, Krupinskaya E, Matrosova V, Gintsburg A. Allelic Variants of *P66* Gene in *Borrelia bavariensis* Isolates from Patients with Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Microorganisms.* 2022 Dec 19;10(12):2509. DOI: 10.3390/microorganisms10122509
19. Неведова ВВ, Коренберг ЭИ, Горелова НБ, Ковалевский ЮВ. Генетическая гетерогенность *Borrelia garinii* в природном очаге Среднего Урала. *Бюллетень ВШНЦ СО РАМН.* 2007;55(3):139-142.
20. Korenberg EI, Nefedova VV, Fadeeva IA, Gorelova NB. Genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Molecular Biology of Spirochetes*. F.C. Cabello, D. Hulska and H.P. Godfrey (Eds.). IOS Press. Amsterdam, 2006;174-199.
21. Gorelova NB, Korenberg EI, Kovalevskii YV, Shcherbakov SV. Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia. *Zentralbl Bakteri.* 1995 Apr;282(3):315-22. DOI: 10.1016/S0934-8840(11)80132-5
22. Тупикова НВ, Сидорова ГА, Коновалова ЭА. Определитель возраста лесных полевков. *Материалы к познанию фауны и флоры СССР.* 1970;45(60):160-167.
23. Ornstein K, Ostberg Y, Bunikis J, Noppa L, Berglund J, Norrby R, et al. Differential immune response to the variable surface loop antigen of P66 of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in geographically diverse populations of lyme borreliosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Nov;9(6):1382-4. DOI: 10.1128/cdli.9.6.1382-1384.2002
24. Humair PF, Turrian N, Aeschlimann A, Gern L. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol (Praha).* 1993;40(1):65-70.
25. Башенина НВ (ред.). Европейская рыжая полевка. М.: Наука, 1981.
26. Коренберг ЭИ, Ананьина ЮВ, Горелова НБ, Савельева ОВ, Ковалевский ЮВ, Петров ЕМ. Южнотоежные сочетанные природные очаги спирохетозов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011 Сен-Окт;(5):27-30.
27. Ковалевский ЮВ, Коренберг ЭИ, Горелова НБ. Многолетняя динамика эпизоотического процесса природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов в горнотоежных лесах Среднего Урала. *Паразитология.* 2004;38(2):105-121.
28. Grigoryeva LA, Miteva OA, Samoylova EP. Parasitic system *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) – *Borrelia garinii* – small mammals in the northwest of Russia. *Proceedings of the Zoological Institute RAS.* 2024;328(2):308-322. DOI: 10.31610/trudyzin/2024.328.2.308
29. Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology (Reading).* 2004 Jun;150(Pt 6):1741-1755. DOI: 10.1099/mic.0.26944-0
30. Фадеева ИА, Коренберг ЭИ, Андрейчук ЮВ, Марков АЛ, Горелова НБ. Аллельные варианты *Borrelia afzelii*, выявленные на основании секвенирования хромосомного гена *p66*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2006;(2):33-36.
31. Hao Q, Liu HX, Hou XX, Zhang L, Yang XN, Wan KL. Polymorphism of P66 in *Borrelia burgdorferi* Strains in China. *Biomed Environ Sci.* 2021 May 20;34(5):364-371. DOI: 10.3967/bes2021.048
32. Coipan CE, van Duijvendijk GLA, Hofmeester TR, Takumi K, Sprong H. The genetic diversity of *Borrelia afzelii* is not maintained by the diversity of the rodent hosts. *Parasites Vectors* 2018;(11):454. DOI: 10.1186/s13071-018-3006-2
33. Voordouw MJ, Lachish S, Dolan MC. The Lyme disease pathogen has no effect on the survival of its rodent reservoir host. *PLoS One.* 2015 Feb 17;10(2):e0118265. DOI: 10.1371/journal.pone.0118265
34. Sipari S, Hytönen J, Pietikäinen A, Mappes T, Kallio ER. The effects of *Borrelia* infection on its wintering rodent host. *Oecologia.* 2022 Dec;200(3-4):471-478. DOI: 10.1007/s00442-022-05272-y
35. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YV. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol (Praha).* 2004 Mar;51(1):67-71. DOI: 10.14411/fp.2004.010
36. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013 Feb;4(1-2):46-51. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.008

References

1. Korenberg EI, Pomelova VG, Osin NS. *Prirodnookhagovye infekcii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami*. Moscow: Kommentarij, 2013. (In Russian).
2. Hunfeld K-P, Gray J. *Lyme Borreliosis*. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022.
3. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB. Multilocus Sequence Analysis of "Atypical" *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolated in Russia. *Mol Gen Mikrobiol Virol.* 2017;32:196-203. DOI: 10.3103/S0891416817040073
4. Golidonova KA, Korenberg EI, Gorelova NB, Ginzburg AL. Multilocus Sequence Analysis of Isolates from Patients with the Erythemic Form of Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Mol Gen Microbiol Virol.* 2021;36:170-175. DOI: 10.3103/S089141682104008X
5. Rudakova SA, Teslova OE, Mutalynova NE, Pen'evskaya NA, Blokh AI, Rudakov NV, et al. Review of the Epidemiological Situation on Ixodic Tick-Borne Borreliosis in the Russian Federation in 2013–2022 and Forecast for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2023;2:75-87. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-75-87 (In Russian).
6. Gern L, Humair P. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;149-174. DOI: 10.1079/9780851996325.0149
7. Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YuV. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;175-200. DOI: 10.1079/9780851996325.01

8. Balashov YuS. Parazitizm kleshchej i nasekomyh na nazemnyh pozvonochnyh. Saint Petersburg: Nauka, 2009. (In Russian).
9. Gromov IM. Mlekopitayushchie fauny Rossii i sopredel'nyh territorij. Zajceobraznye i gryzuny. Saint Petersburg: ZIN, 1995. (In Russian).
10. Lisovsky AA (Eds). The Mammals of Russia: species list and applied issues. Moscow: KMK Sci. Press, 2019. (In Russian).
11. Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao WC, Chu C, et al. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013 Nov;63(Pt 11):4284-4288. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0
12. Margos G, Fingerle V, Reynolds SE. *Borrelia bavariensis*: Vector Switch, Niche Invasion, and Geographical Spread of a Tick-Borne Bacterial Parasite. *Front Ecol Evol*. 2019;7:401. DOI: 10.3389/fevo.2019.00401
13. Samuels DS, Radolf JD. *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. Caister Academic Press: Poole, UK, 2010;299-331.
14. Coburn J, Cugini C. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin α 5 β 3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Jun 10;100(12):7301-6. DOI: 10.1073/pnas.1131117100
15. Curtis MW, Fierros CH, Hahn BL, Surdel MC, Kessler J, Anderson PN, et al. Identification of amino acid domains of *Borrelia burgdorferi* P66 that are surface exposed and important for localization, oligomerization, and porin function of the protein. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Sep 23;12:991689. DOI: 10.3389/fcimb.2022.991689
16. Tan X, Castellanos M, Chaconas G. Choreography of Lyme Disease Spirochete Adhesins To Promote Vascular Escape. *Microbiol Spectr*. 2023 Aug 17;11(4):e0125423. DOI: 10.1128/spectrum.01254-23
17. Korenberg EI, Vorob'eva NN, Sumlivaya ON, Frizen VI, Afanas'eva MV. Infekcii, peredayushchiesya iksoodovymi kleshchami, v Permskom krae (etiologiya, epidemiologiya, patogenez, klinika, diagnostika, lechenie i profilaktika). Metodicheskie rekomendacii dlya vrachej. Perm', 2007. (In Russian).
18. Golidonova K, Korenberg E, Krupinskaya E, Matrosova V, Gintsburg A. Allelic Variants of P66 Gene in *Borrelia bavariensis* Isolates from Patients with Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Microorganisms*. 2022 Dec 19;10(12):2509. DOI: 10.3390/microorganisms10122509
19. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskij YuV. Geneticheskaya geterogennost' *Borrelia garinii* v prirodnom ochage Srednego Urala. *Byulleten' VSNC SO RAMN*. 2007;55(3):139-142. (In Russian).
20. Korenberg EI, Nefedova VV, Fadeeva IA, Gorelova NB. Genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Molecular Biology of Spirochetes*. F.C. Cabello, D. Hulska and H.P. Godfrey (Eds.). IOS Press. Amsterdam, 2006;174-199.
21. Gorelova NB, Korenberg EI, Kovalevskii YV, Shcherbakov SV. Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia. *Zentralbl Bakteri*. 1995 Apr;282(3):315-22. DOI: 10.1016/S0934-8840(11)80132-5
22. Tupikova NV, Sidorova GA, Konovalova EA. Opredelitel' vozrasta lesnyh polevok. *Materialy k poznaniyu fauny i flory SSSR*. 1970;45(60):160-167. (In Russian).
23. Ornstein K, Ostberg Y, Bunikis J, Noppa L, Berglund J, Norrby R, et al. Differential immune response to the variable surface loop antigen of P66 of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in geographically diverse populations of Lyme borreliosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Nov;9(6):1382-4. DOI: 10.1128/cdli.9.6.1382-1384.2002
24. Humair PF, Turrian N, Aeschlimann A, Gern L. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol (Praha)*. 1993;40(1):65-70.
25. Bashenina NV (red.). *Evropejskaya ryzhaya polevka*. Moscow: 'Nauka' Publ., 1981. (In Russian).
26. Korenberg EI, Anan'ina IuV, Gorelova NB, Savel'eva OV, Kovalevskii IuV, Petrov EM. Yuzhnatoezhnye sochetannye prirodnye ochagi spirochetozov. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2011 Sep-Oct;(5):27-30. (In Russian).
27. Kovalevskij YuV, Korenberg EI, Gorelova NB. Mnogoletnyaya dinamika epizooticheskogo processa prirodnih ochagov iksoodovyh kleshchevyh borreliozov v gornotaezhnyh leash Srednego Urala. *Parazitologiya*. 2004;38(2):105-121. (In Russian).
28. Grigoryeva LA, Miteva OA, Samoylova EP. Parasitic system *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) – *Borrelia garinii* – small mammals in the northwest of Russia. *Proceedings of the Zoological Institute RAS*. 2024;328(2):308-322. DOI: 10.31610/trudyzin/2024.328.2.308. (In Russian).
29. Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology (Reading)*. 2004 Jun;150(Pt 6):1741-1755. DOI: 10.1099/mic.0.26944-0
30. Fadeeva IA, Korenberg EI, Andreichuklu V, Markov AL, Gorelova NB. Allele variants of *Borrelia afzelii* found by sequencing of the chromosome gene *p66*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2006;(2):33-6. (In Russian).
31. Hao Q, Liu HX, Hou XX, Zhang L, Yang XN, Wan KL. Polymorphism of P66 in *Borrelia burgdorferi* Strains in China. *Biomed Environ Sci*. 2021 May 20;34(5):364-371. DOI: 10.3967/bes2021.048
32. Coipan CE, van Duijvendijk GLA, Hofmeester TR, Takumi K, Sprong H. The genetic diversity of *Borrelia afzelii* is not maintained by the diversity of the rodent hosts. *Parasites Vectors* 2018;(11):454. DOI: 10.1186/s13071-018-3006-2
33. Voordouw MJ, Lachish S, Dolan MC. The Lyme disease pathogen has no effect on the survival of its rodent reservoir host. *PLoS One*. 2015 Feb 17;10(2):e0118265. DOI: 10.1371/journal.pone.0118265
34. Sipari S, Hytönen J, Pietikäinen A, Mappes T, Kallio ER. The effects of *Borrelia* infection on its wintering rodent host. *Oecologia*. 2022 Dec;200(3-4):471-478. DOI: 10.1007/s00442-022-05272-y
35. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YV. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol (Praha)*. 2004 Mar;51(1):67-71. DOI: 10.14411/fp.2004.010
36. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013 Feb;4(1-2):46-51. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.008

Информация о соавторах:

Коренберг Эдуард Исаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Ковалевский Юрий Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Горелова Наталия Борисовна, научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Матросова Вера Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН

Information about co-authors:

Eduard I. Korenberg, PhD, DSc (Biological Sciences), professor, principal researcher of Laboratory of Infection Vectors, N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Yurii V. Kovalevskii, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Infection Vectors; N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Natalia B. Gorelova, Researcher of Laboratory of Infection Vectors; N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Vera A. Matrosova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology

Молекулярная динамика формирования ниосом в качестве носителя эндогенных дефензинов в биопленках с антибиотикорезистентными бактериями

Ф.И.Базиков¹, А.А.Глушко², И.А.Базиков¹, А.Н.Мальцев¹, А.А.Ефременко¹, Е.И.Дискаева¹

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Российская Федерация;

Для моделирования физико-химических процессов в молекулярной динамике использовали пакет программ «Gromacs» и два метода: крупнозернистый и полноатомный. Был отмечен энергетически выгодный процесс моделирования биомолекул, имеющих много связанных взаимодействий между атомами. По результатам проведенного моделирования можно сделать вывод о способности ниосом формировать двойной слой в водной среде. Полученные результаты коррелировали с изучением антимикробной активности эндогенных дефензинов *in vitro*, что важно для распознавания механизмов взаимодействия антимикробных пептидов и мембран клеточных стенок (пептидогликана) антибиотикорезистентных микроорганизмов.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, ниосомы, дефензины, антибиотикорезистентные бактерии, антимикробная активность

Для цитирования: Базиков Ф.И., Глушко А.А., Базиков И.А., Мальцев А.Н., Ефременко А.А., Дискаева Е.И. Молекулярная динамика формирования ниосом в качестве носителя эндогенных дефензинов в биопленках с антибиотикорезистентными бактериями. Бактериология. 2025; 10(1): 58–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-58-62

Molecular dynamics of niosome formation as endogenous defensin transporter in biofilms with antibiotic-resistant bacteria

F.I.Bazikov¹, A.A.Glushko², I.A.Bazikov¹, A.N.Maltsev¹, A.A.Efremenko¹, E.I.Diskaeva¹

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russian Federation;

To simulate physicochemical processes in molecular dynamics, the Gromacs software package and two methods were used: coarse-grained and full-atomic. An energetically advantageous process of modeling biomolecules having many related interactions between atoms has been noted. Based on the results of the modeling, we conclude that niosomes can form a double layer in an aqueous environment. The obtained results correlated with the study of the antimicrobial activity of endogenous defensins *in vitro*, which is important for recognizing the mechanisms of interaction of endogenous defensins and membranes of cell walls (peptidoglycan) of antibiotic-resistant microorganisms.

Key words: molecular modeling, niosomes, defensins, antibiotic-resistant bacteria, antimicrobial activity

For citation: Bazikov F.I., Glushko A.A., Bazikov I.A., Maltsev A.N., Efremenko A.A., Diskaeva E.I. Molecular dynamics of niosome formation as endogenous defensin transporter in biofilms with antibiotic-resistant bacteria. Bacteriology. 2025; 10(1): 58–62. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-58-62

Для корреспонденции:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-24-75

Статья поступила 02.05.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Igor A. Bazikov, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-24-75

The article was received 02.05.2024, accepted for publication 31.03.2025

Биопленки представляют собой основную форму жизни большинства микроорганизмов в естественной среде, как сообщество микроорганизмов, растущее на различной поверхности. Эта высокоспециализированная трехмерная структура характеризуется высокой устойчивостью к противомикробным препаратам [1]. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) являются неотъемлемой частью врожденного иммунитета человека. Их активность против широкого спектра бактерий, в том числе антибиотикорезистентных, хорошо известна [2]. Перспективным направлением, обеспечивающим пролонгированность и снижение побочных эффектов, является использование нановезикул – ниосом. Однако механизмы этих взаимодействий не до конца изучены. Моделирование *in silico* на компьютере структуры и функции молекул позволяет изучить закономерности и законы взаимодействий живых клеток. Целевая доставка эндогенных дефензинов ниосомами кремнийорганической природы направлена на повышение эффективности их проникновения в биопленки с антибиотикорезистентными бактериями [3–5]. Молекулярная динамика *in silico* изучает, как молекулы распознают друг друга и как будет происходить движение молекул во времени, к примеру, знание структуры рецептора и структуры действующей на него молекулы позволяет промоделировать их взаимодействие для рационального конструирования лекарств. В последующем необходима визуализация результатов при изучении антимикробной активности эндогенных дефензинов *in vitro*.

Цель исследования: молекулярное моделирование *in silico* начального этапа направленной доставки эндогенных антимикробных дефензинов в мембрану антибиотикорезистентных бактерий с последующим изучением антимикробной активности *in vitro*.

Материалы и методы

Первоначально проводили изучение процесса формирования ниосом методом молекулярной динамики. В качестве поверхностно-активного вещества – элемента мембраны ниосомы был выбран эфир полиэтиленгликоля (ПЭГ) и полидиметилсилоксана (ПДМС) производства компании Dow Corning. Для построения модели этих молекул проводили их параметризацию методом классической и крупнозернистой молекулярной динамики в программе GROMACS (рис. 1).

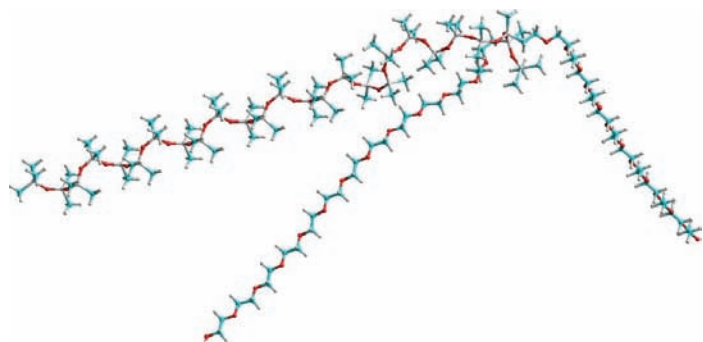


Рис. 1. Пространственная структура вещества DC 5329 после оптимизации геометрии методом молекулярной механики mm+ в программе HyperChem.

Fig. 1. Spatial structure of the substance DC 5329 after geometry optimization using the mm+ molecular mechanics method in the HyperChem program.

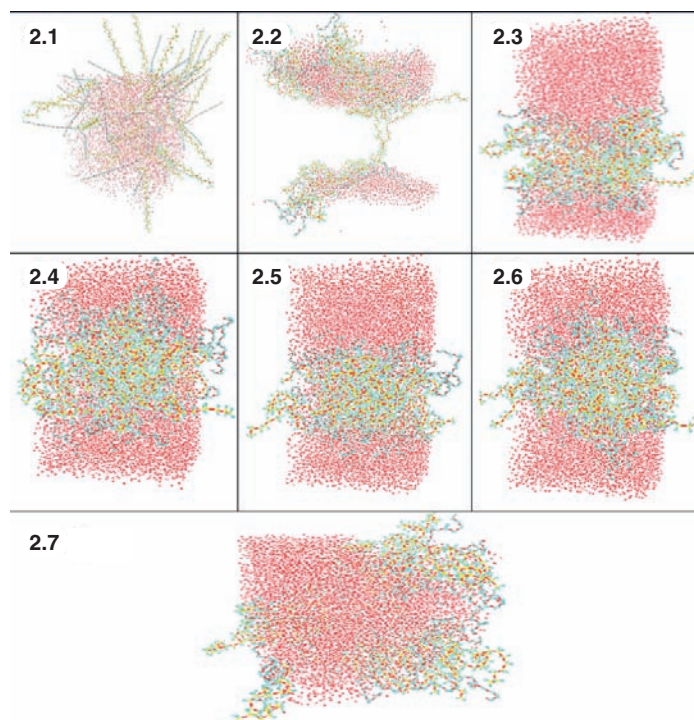


Рис. 2. Моделирование молекулярной динамики самосборки мембраны ниосомы (графическое пространственное изображение моделируемой системы: время 0–80 нс).

Fig. 2. Molecular dynamics simulation of niosome membrane self-assembly (Graphical spatial representation of the simulated system: time 0–80 ns).

Пространственная структура ниосом была построена в программе HyperChem в соответствии со структурной формулой [6, 7]. Для моделирования сборки мембраны было использовано силовое поле OPLS-AA. Предварительно проводилась оптимизация геометрии системы градиентным методом [8, 9]. Далее производилось моделирование молекулярной динамики в соответствии с протоколом.

Альфа-дефензины выделяли из клеток крови, а бета-дефензины – из плацентарной ткани по оригинальной методике [10]. Выделенные АМП затем инкапсулировали в кремнийорганические ниосомы [11].

Антимикробную активность антибиотика оценивали на культурах *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 по значению минимальной подавляющей концентрации антибиотика (МПК) после микроразведений в бульоне. При посеве по 0,1 мл культуры из разведения 10^{-6} через 18 ± 2 ч при температуре инкубации $37 \pm 1^\circ\text{C}$ *E. coli* вырастала на плотной питательной среде в виде колоний светло-желтого цвета диаметром 2,0–2,5 мм, а *S. aureus* – в виде колоний желтого цвета диаметром 1,0–1,2 мм.

Результаты исследования и их обсуждение

Сборка модели системы, состоящей из молекул эфира ПЭГ, ПДМС и воды, методами молекулярной динамики в изобарно-изотермических условиях (NPT-ансамбль) выявила формирование двойного слоя молекул эфира ПЭГ и ПДМС. Первоначально проводили моделирование самосборки мембраны ниосомы методом классической молекулярной динамики [12, 13]. Расположение молекул ниосом

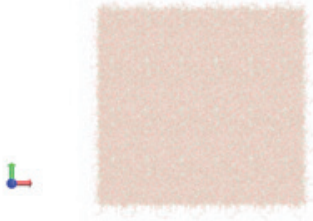
Время, нс	Графическое пространственное изображение моделируемой системы
Термодинамическое уравнивание	
0	
100	
300	
640	

Рис. 3. Формирование двухслойной мембраны ниосомы: время 0–640 нс.
 Fig. 3. Formation of the bilayer membrane of niosome: time 0–640 ns.

производилось случайным образом, после чего добавлялись молекулы воды таким образом, чтобы заполнить пустое пространство между молекулами (рис. 2).

Предварительно проводилась оптимизация геометрии системы градиентным методом [14]. Далее производилось моделирование молекулярной динамики в соответствии с протоколом.

По результатам проведенного моделирования можно сделать вывод о способности ниосом формировать двойной слой в водной среде. При этом полидиметилсилоксановая часть молекул ниосом располагалась во внутренней части двойного слоя, а полиэтиленгликолевые фрагменты обращены к водной среде. Формирование двойного слоя происходило в течение 50–80 нс моделирования, включая этап термодинамического уравнивания. Полученная структура далее использовалась для сборки и моделирования более крупного фрагмента мембраны ниосомы. Для этого был сформирован фрагмент мембраны из 9 блоков

(3 × 3 блока). Сборка данного фрагмента мембраны осуществлялась в несколько этапов:

- 1) соединение 9 блоков мембраны DC 5329 (3 ряда по 3 блока) в структуру;
- 2) добавление молекул воды;
- 3) оптимизация геометрии в силовом поле OPLS;
- 4) моделирование молекулярной динамики в соответствии с протоколом в течение 37 нс.

По результатам моделирования были определены параметры фрагмента мембраны ниосомы: толщина мембраны, размеры фрагмента, площадь фрагмента, количество молекул ниосом на единицу площади мембраны ниосомы. Далее была произведена сборка системы с хаотичным расположением ниосом и 80 000 молекул воды (1 частица в методе крупнозернистой молекулярной динамики представляет 4 молекулы воды) (рис. 3).

Таким образом, можно сделать вывод, что происходит самоорганизация двуслойной мембраны ниосомы в различных временных интервалах. Формирование двойного слоя завершилось в течение 700–800 нс моделирования. Мембрана образуется самопроизвольно и является термодинамически устойчивой структурой.

Аналогичное моделирование самосборки мембраны ниосомы было произведено с использованием метода крупнозернистой молекулярной динамики в силовом поле Martini 3.0. [15]. При этом фрагмент мембраны приобретает форму искривленного диска толщиной 10–12 нм с небольшим утолщением на краю до 12–13 нм (рис. 4, 5).

Интерпретационные таблицы EUCAST содержат «Пограничные значения МИК для определения клинических категорий чувствительности бактерий к антибиотикам», где для результатов определения МПК клинических штаммов стафилококков и кишечной палочки к ципрофлоксацину предусмотрены следующие значения оценочных категорий: стафилококки, МПК: Ч (чувствительные) – меньше или равно ($\leq$) 1 мкг/мл, Р (резистентные) – >2 мкг/мл; кишечная палочка, МПК: Ч $\leq 0,5$ мкг/мл, Р $> 0,5$ мкг/мл.

В соответствии с этими данными оценивали результаты экспериментов по определению МПК антимикробных агентов с точки зрения оценочных категорий чувствительности тестируемых штаммов к ципрофлоксацину и бацитрацину и косвенно судили об активности ниосомальных форм альфа- и бета-дефензинов в отношении указанных микроорганизмов в сравнении с ципрофлоксацином.

Таблица. Активность пептидов и противомикробных препаратов против тестируемых бактериальных штаммов
 Table. Activity of peptides and antimicrobial drugs against the tested bacterial strains

Антимикробный агент / Antimicrobial substance	МПК, мкг/мл / MIC, mcg/ml		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Бацитрацин / Bacitracin	512 / >512	128 / 128	32 / 64
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	0,25 / 0,25	0,5 / 0,5	0,25 / 0,5
Ниосомальная форма альфа-дефензина / Niosomal form of alpha-defensin	8 / 16	8 / 16	1 / 1
Ниосомальная форма бета-дефензина / Niosomal form of beta-defensin	16 / 32	8 / 16	1 / 1

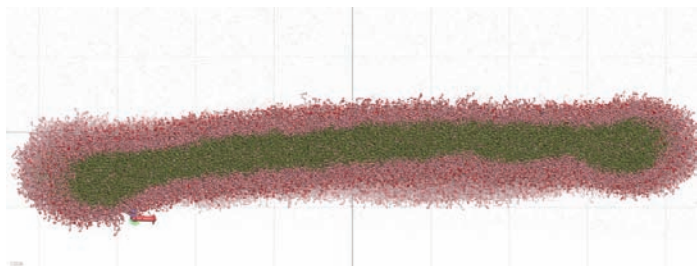


Рис. 4. Строение фрагмента мембраны ниосомы по результатам моделирования крупнозернистой молекулярной динамики – вид вдоль оси Y (шаг сетки 10 нм).

Fig. 4. Structure of a fragment of the niosome membrane based on the results of coarse-grained molecular dynamics simulations – view along the Y axis (grid step 10 nm).

При изучении антимикробной активности испытанные соединения показали разнообразные результаты в анализе МПК, выполненном для эталонных штаммов бактерий (таблица). Помимо бацитрацина, который оказался наименее активным, обычные противомикробные препараты продемонстрировали относительно более высокую активность по сравнению с АМП. Рост *E. coli* ингибировался цiproфлоксацином в концентрации 0,25 мкг/л, тогда как наиболее активные пептиды были эффективны при 8 мкг/л. Эти бактерии были восприимчивы к цiproфлоксацину, в то время как АМП и бацитрацин проявляли довольно слабую антибактериальную активность.

Протестированные ниосомальные формы дефензинов показали заметно более выраженную активность против грамположительных бактерий. Наиболее восприимчивым штаммом был *S. epidermidis* (значение МПК 0,5–1 мкг/л). Бацитрацин также проявлял более сильную активность в отношении грамположительных штаммов.

In vitro все тестируемые штаммы *S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. coli* обладали чувствительностью к цiproфлоксацину и ниосомальным формам альфа- и бета-дефензинов. При этом в аналогичных концентрациях МИК альфа-дефензина и, особенно, бета-дефензина были в 2–4 раза ниже по сравнению с аналогичными показателями для цiproфлоксацина.

Заключение

Таким образом, ниосомы в водной среде формируют двухслойную мембрану толщиной 8–12 нм; гидрофильные группы (фрагменты ПЭГ) обращены к водной фазе, гидрофобные фрагменты ПДМС сосредоточены во внутренней части мембраны; мембрана образуется самопроизвольно и является термодинамически устойчивой структурой. Затем двухслойная мембрана укладывается в диск, у него округляются края, и диск сворачивается в везикулу.

In vitro все тестируемые штаммы *S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. coli* обладали чувствительностью к цiproфлоксацину и ниосомальным формам альфа- и бета-дефензинов. При этом в аналогичных концентрациях МПК альфа-дефензина и, особенно, бета-дефензина были в 2–4 раза ниже по сравнению с аналогичными показателями для цiproфлоксацина.

Полученные результаты помогут в дальнейшем изучать механизмы взаимодействия эндогенных дефензинов и мем-

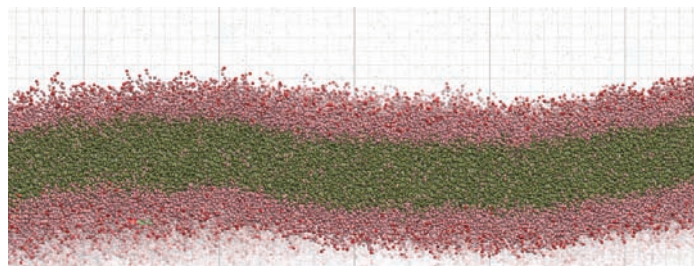


Рис. 5. Строение фрагмента мембраны ниосомы по результатам моделирования крупнозернистой молекулярной динамики – вид вдоль оси Y (шаг сетки 1 нм).

Fig. 5. Structure of a fragment of the niosome membrane based on the results of coarse-grained molecular dynamics simulations – view along the Y axis (grid step 1 nm).

бран клеточных стенок (пептидогликана) антибиотикорезистентных микроорганизмов.

Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The study was carried out within the framework of budgetary funding.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Dawgul M, Maciejewska M, Jaskiewicz M, Karafova A, Kamysz W. Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta Pol Pharm*. 2014 Jan-Feb;71(1):39-47.
2. Gordya N, Yakovlev A, Kruglikova A, Tulin D, Potolitsina E, Suborova T, et al. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. *PLoS One*. 2017 Mar 9;12(3):e0173559. DOI: 10.1371/journal.pone.0173559
3. Diskaeva EI, Vechev OV, Diskaeva EN, Bazikov IA, Elbekyan KS. Review of methods for size and morphology determination of vesicles in niosome dispersion. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*. 2020;20(3):377-381. DOI: 10.17586/2226-1494-2020-20-3-377-381 (In English).
4. Diskaeva EI, Vechev OV, Bazikov IA, Elbekyan KS, Diskaeva EN. Dependence of the viscosity coefficient of the niosomal dispersion on the temperature and particle size of the dispersed phase. *Acta Polytechnica*. 2021;61(2):336-341. DOI: 10.14311/AP.2021.61.0336
5. Diskaeva EI, Vechev OV, Diskaeva EN, Bazikov IA, Elbekyan KS. Experimental investigation of rheological properties of niosomal dispersions. *Nanosystems: Phys. Chem. Math*. 2023;14(2):195-201. DOI: 10.17586/2220-8054-2023-14-2-195-201
6. Abraham MJ, Páll S, Hess B, Lindahl E, Schulz R, Smith JC, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
7. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques*. 1993 Jun;14(6):1010-3.
8. Глушко АА. Изучение лиганд-рецепторного взаимодействия методом молекулярной динамики. Казань: Общество с ограниченной ответственностью "Бук", 2022.

9. Ramirez UD, Myachina F, Stith L, Jaffe EK. Docking to large allosteric binding sites on protein surfaces. *Adv Exp Med Biol.* 2010;680:481-8. DOI: 10.1007/978-1-4419-5913-3_54
10. Базиков ИА, Ефременко АА, Мальцев АН, Базиков ФИ. Оптимизация выделения эндогенных бета-дефензинов. Патент на изобретение RU 2825572, 24.01.2024.
11. Базиков ИА, Мальцев АН, Рамеш КГ, Амиджахан НА. Ниосомальный анти-микробный гель для лечения диабетических язв, ран, ожогов, в том числе инфицированных антибиотико-резистентными микроорганизмами. Патент на изобретение 2781402C2, 11.10.2022.
12. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B.* 2007 Jul 12;111(27):7812-24. DOI: 10.1021/jp071097f
13. Cambiaso S, Rasera F, Rossi G, Bochicchio D. Development of a transferable coarse-grained model of polydimethylsiloxane. *Soft Matter.* 2022 Oct 19;18(40):7887-7896. DOI: 10.1039/d2sm00939k
14. Grünewald F, Alessandri R, Kroon PC, Monticelli L, Souza PCT, Marrink SJ. PolyPy; a python suite for facilitating simulations of macromolecules and nanomaterials. *Nat Commun.* 2022 Jan 10;13(1):68. DOI: 10.1038/s41467-021-27627-4
15. Souza PCT, Alessandri R, Barnoud J, Thallmair S, Faustino I, Grünewald F, et al. Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. *Nat Methods.* 2021 Apr;18(4):382-388. DOI: 10.1038/s41592-021-01098-3

References

1. Dawgul M, Maciejewska M, Jaskiewicz M, Karafova A, Kamysz W. Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta Pol Pharm.* 2014 Jan-Feb;71(1):39-47.
2. Gordya N, Yakovlev A, Tulin D, Potolitsina E, Suborova T, et al. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. *PLoS One.* 2017 Mar 9;12(3):e0173559. DOI: 10.1371/journal.pone.0173559
3. Diskaeva EI, Vecher OV, Diskaeva EN, Bazikov IA, Elbekyan KS. Review of methods for size and morphology determination of vesicles in niosome dispersion. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics.* 2020;20(3):377-381. DOI: 10.17586/2226-1494-2020-20-3-377-381 (In English).
4. Diskaeva EI, Vecher OV, Bazikov IA, Elbekyan KS, Diskaeva EN. Dependence of the viscosity coefficient of the niosomal dispersion on the temperature and particle size of the dispersed phase. *Acta Polytechnica.* 2021;61(2):336-341. DOI: 10.14311/AP.2021.61.0336
5. Diskaeva EI, Vecher OV, Diskaeva EN, Bazikov IA, Elbekyan KS. Experimental investigation of rheological properties of niosomal dispersions. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2023;14(2):195-201. DOI: 10.17586/2220-8054-2023-14-2-195-201
6. Abraham MJ, Páll S, Hess B, Lindahl E, Schulz R, Smith JC, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015;1-2:19-25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
7. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques.* 1993 Jun;14(6):1010-3.
8. Glushko AA. Изучение лиганд-рецепторного взаимодействия методом молекулярной динамики. *Казан': Obshchestvo s ogranichennoi otvetstvennost'yu "Buk", 2022. (In Russian).*

9. Ramirez UD, Myachina F, Stith L, Jaffe EK. Docking to large allosteric binding sites on protein surfaces. *Adv Exp Med Biol.* 2010;680:481-8. DOI: 10.1007/978-1-4419-5913-3_54
10. Bazikov IA, Efremenko AA, Mal'tsev AN, Bazikov FI. Optimizatsiya vydeleniya endogennykh beta-defenzinov. Patent na izobretenie RU 2825572, 24.01.2024. (In Russian).
11. Bazikov IA, Mal'tsev AN, Ramesh KG, Amidzhakhan NA. Niosomal'nyi antimikrobyi gel' dlya lecheniya diabeticheskikh yazv, ran, ozhogov, v tom chisle infitsirovannykh antibiotiko-rezistentnymi mikroorganizmami. Patent na izobretenie 2781402C2, 11.10.2022. (In Russian).
12. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B.* 2007 Jul 12;111(27):7812-24. DOI: 10.1021/jp071097f
13. Cambiaso S, Rasera F, Rossi G, Bochicchio D. Development of a transferable coarse-grained model of polydimethylsiloxane. *Soft Matter.* 2022 Oct 19;18(40):7887-7896. DOI: 10.1039/d2sm00939k
14. Grünewald F, Alessandri R, Kroon PC, Monticelli L, Souza PCT, Marrink SJ. PolyPy; a python suite for facilitating simulations of macromolecules and nanomaterials. *Nat Commun.* 2022 Jan 10;13(1):68. DOI: 10.1038/s41467-021-27627-4
15. Souza PCT, Alessandri R, Barnoud J, Thallmair S, Faustino I, Grünewald F, et al. Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. *Nat Methods.* 2021 Apr;18(4):382-388. DOI: 10.1038/s41592-021-01098-3

Информация о соавторах:

Базиков Филипп Игоревич, аспирант кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России

Глушко Александр Алексеевич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории медицинских биотехнологий и нанотехнологий ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России

Ефременко Анна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России

Дискаева Елена Игоревна, кандидат физико-математических наук, доцент, заведующая кафедрой физики и математики ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России

Information about co-authors:

Filipp I. Bazikov, postgraduate student of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Aleksandr A. Glushko, PhD in Pharmaceutical Sciences, associate professor of the Department of Inorganic, Physical and Colloid Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education VolgSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation

Aleksandr N. Maltsev, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the laboratory of medical biotechnology and nanotechnology, Stavropol State Medical University

Anna A. Efremenko, PhD, MD, associate professor of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Elena I. Diskaeva, PhD in physics and mathematics Sciences, associate professor, head of the Department of Physics and Mathematics, Stavropol State Medical University

Оценка эффективности фаговых коммерческих препаратов в отношении клинических штаммов бактерий

О.В.Азовскова, Р.П.Терехова, С.А.Прудникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В.Вишневского»
Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Глобальное распространение антибиотикорезистентности микроорганизмов диктует необходимость внедрения в практику альтернативных методов профилактики и лечения инфекционных состояний. Такой альтернативой является использование вирулентных бактериофагов. Эффективность фаговой терапии напрямую зависит от литической активности предлагаемых лекарственных бактериофагов.

Цель. Оценка эффективности коммерческих фаговых препаратов производителя НПО «Микроген» в отношении как чувствительных, так и устойчивых к антибиотикам клинических штаммов бактерий.

Материалы и методы. В исследование было включено 5 комплексных препаратов бактериофагов и 3 монофага, изготовленных на производственных платформах НПО «Микроген», Россия. Для проведения микробиологического исследования был использован бактериологический метод исследования. Выделение и идентификацию выделенных бактериальных культур, а также определение чувствительности бактерий к антибиотикам проводили согласно общепринятым методикам в микробиологической лаборатории. Фагочувствительность выделенных клинических штаммов определяли согласно МР «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике 2022 г.», Москва, методом «spot-testa».

Результаты. Всего протестировано 350 клинических штаммов бактерий, из них 267 штаммов – грамотрицательные и 83 штамма – грамположительные бактерии. Чувствительность микроорганизмов к действию фагов варьировала от 16 до 90% для всех изученных штаммов бактерий. Наибольшей литической активностью в отношении коагулазоположительных и коагулазоотрицательных штаммов рода *Staphylococcus* обладали комплексные фаги: Пиофаг (90% и 86,6% соответственно), Интестифаг (Н. Новгород) (86,6% и 76,6% соответственно) и монофаг стафилококковый (Н. Новгород) – 90% и 76,6% соответственно). В отношении штаммов *Escherichia coli* наибольшей литической активностью обладал колипротейный бактериофаг (57,6%), в отношении *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* – Секстафаг (47,4% и 51,5% соответственно). Среди антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) и гипермукоидных антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* не обнаружено штаммов, обладающих резистентностью к заявленным коммерческим бактериофагам.

Заключение. Высокая гетерогенность популяций выделенных штаммов антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных бактерий, демонстрирующих изменение спектра фагочувствительности, диктует необходимость регулярного мониторинга за изменением чувствительности микроорганизмов к предлагаемым лекарственным фаговым препаратам.

Ключевые слова: бактерии, антибиотикорезистентность, бактериофаги, фагорезистентность, фагочувствительность

Для цитирования: Азовскова О.В., Терехова Р.П., Прудникова С.А. Оценка эффективности фаговых коммерческих препаратов в отношении клинических штаммов бактерий. Бактериология. 2025; 10(1): 63–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-63-70

Evaluation of the effectiveness of phage commercial drugs in relation to clinical strains of bacteria

O.V.Azovskova, R.P.Terekhova, S.A.Prudnikova

A.V.Vishnevsky Center of Surgery, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

The global spread of antibiotic resistance among microorganisms necessitates the introduction of alternative methods for preventing and treating infectious diseases into clinical practice. Bacteriophage therapy presents a promising alternative. The effectiveness of this therapy hinges on the lytic activity of the proposed medicinal bacteriophages.

Material and methods. This study included five complex and three monophage preparations manufactured by NPO Microgen, Russia. A standard bacteriological research methodology was employed for the microbiological analysis. Isolation and identification of bacterial cultures, along with antibiotic susceptibility testing, were performed using established laboratory

Для корреспонденции:

Азовскова Ольга Васильевна, кандидат медицинских наук, доцент, врач-бактериолог, лаборатория профилактики и лечения бактериальных инфекций ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России

Адрес: 117997, Москва, ул. Большая Серпуховская, 27, стр. 4

E-mail: Azovskova@ixv.ru

ORCID: 0000-0002-2976-3381

Статья поступила 30.05.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Olga V. Azovskova, MD, PhD, Associate Professor, Bacteriologist, Laboratory for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections, A.V.Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Ministry of Health of Russia

Address: 27 Bolshaya Serpukhovskaya str., Moscow, 117997, Russian Federation

E-mail: Azovskova@ixv.ru

ORCID: 0000-0002-2976-3381

The article was received 30.05.2024, accepted for publication 31.03.2025

protocols. Phage sensitivity of the isolated clinical strains was determined according to the “Rational use of bacteriophages in therapeutic and antiepidemic practice” guidelines (2022), Moscow, utilizing the “spot-test” method.

Results. A total of 350 clinical bacterial strains were tested, comprising 267 Gram-negative and 83 Gram-positive bacteria. The sensitivity of microorganisms to phage action varied considerably, ranging from 16% to 90% across all studied bacterial strains. Complex phages exhibited the highest lytic activity against coagulase-positive and coagulase-negative strains of *Staphylococcus*: Pyophage (90% and 86.6%, respectively), Intestinal phage (Nizhny Novgorod) (86.6% and 76.6%, respectively), and staphylococcal monophage (Nizhny Novgorod) (90% and 76.6%, respectively). Coliprotein bacteriophage demonstrated the highest lytic activity against *Escherichia coli* strains (57.6%), while Sextaphage showed efficacy against *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* (47.4% and 51.5%, respectively). Notably, no resistance to the commercially available bacteriophages was observed among antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains or hypermucoid antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains.

Conclusion. The high heterogeneity observed in populations of both antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant bacteria, coupled with variations in phage sensitivity spectra, emphasizes the need for ongoing surveillance of microbial susceptibility to proposed medicinal phage preparations.

Key words: bacteriophages, phage resistance, phage sensitivity, antibiotic resistance, bacteria

For citation: Azovskova O.V., Terekhova R.P., Prudnikova S.A. Evaluation of the effectiveness of phage commercial drugs in relation to clinical strains of bacteria. Bacteriology. 2025; 10(1): 63–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-63-70

На протяжении века широкому кругу исследователей известно о существовании вирусов, паразитирующих на бактериях. Еще в 1897 г. российский микробиолог Н.Ф.Гамалея описывал явление лизиса сибиреязвенной палочки неизвестным перевиваемым агентом. Однако намного позже, благодаря исследованиям франко-канадского ученого Феликса д'Эрреля и английского микробиолога Фредерика Уильяма Туорта, мир впервые узнал об этих перевиваемых агентах, названных бактериофагами. С тех пор, когда впервые были опубликованы данные о существовании «убийц» бактерий и началась напряженная работа по применению самых передовых в то время методов исследования бактериофагов, включая физические, биохимические, физиологические, морфологические, генетические, прошло более 100 лет. Большую роль в фундаментальных исследованиях по бактериофагам и их практическом применении, в частности в медицине, сыграл грузинский ученый Г.Г.Элиава. В 30-е годы в Тбилиси Г.Элиава при личной поддержке Ф.Д'Эрреля организовал международный институт бактериофагов, который на сегодняшний день послужил основой для организации платформы НПО «Бактериофаг» в России с ее производственными площадками в Уфе, Нижнем Новгороде, Перми, Хабаровске. Однако в связи с открытием и широким использованием антибиотиков на протяжении XX столетия, фаготерапия, так же, как и фагопрофилактика, не получили должного развития в практическом здравоохранении.

В настоящее время научный и практический интерес к вирусам бактерий вновь стал неуклонно расти не только в России, но и во всем мире. Причиной заинтересованности специалистов являются назревшие проблемы в лечении и профилактике инфекционных осложнений, вызванных микроорганизмами, проявляющими устойчивость к антибиотикам. В стационарах (особенно многопрофильных) создаются условия, ускоряющие темпы эволюции микроорганизмов, формируются патогены с множественной и экстремальной резистентностью не только к антибиотикам, но и к дезинфекционным средствам. Глобальное распространение полирезистентных штаммов отягощает течение заболеваний и более чем в 13% процентов случаев лежит в основе летальности пациентов, особенно с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [1, 2].

По мнению экспертов, при сохранении нынешней тенденции ситуация в борьбе с инфекционными заболеваниями в скором времени может стать такой же, какой была до открытия антибиотиков. В этой связи ВОЗ и национальные органы здравоохранения во всем мире привлекают внимание к острой необходимости срочного решения проблемы лекарственной устойчивости, призывая всемерно поддерживать усилия по разработке новых способов борьбы с инфекционными заболеваниями. В сложившихся условиях одним из эффективных компонентов борьбы с бактериальными инфекциями, в том числе вызванными антибиотикорезистентными штаммами, может стать использование бактериофагов.

Фаготерапия по праву имеет определенные преимущества перед антибиотикотерапией. При использовании бактериофагов отсутствуют выраженные побочные эффекты. Бактериофаги обладают гораздо более высокой специфичностью, чем антибиотики, что приводит к наименьшему повреждению нормальной микрофлоры организма и, следовательно, к снижению риска заболевания вторичными микробными инфекциями, сопровождающими дисбактериозы. Бактериофаги самостоятельно контролируют свое воспроизведение, размножаясь только при наличии чувствительной культуры. Их также можно использовать в профилактических целях. Препараты местного применения на основе бактериофагов отличаются от антибиотиков способностью проникать глубже в ткани и размножаться там, где есть инфекция [3, 4]. Некоторые исследования указывают на то, что фаговые препараты можно использовать в сочетании с антибиотиками, что уменьшает вероятность развития резистентности бактерий [5–7].

Данные о литической активности имеющихся коммерческих бактериофагов представлены многими авторами, но отсутствует системный анализ чувствительности бактерий к вирионам, в том числе основанный на региональных особенностях. В доступной литературе имеется крайне ограниченное количество работ, посвященных изучению чувствительности клинических изолятов к коммерческим препаратам бактериофагов. Например, в разных публикациях на небольших выборках микроорганизмов показана чувствительность от 43 до 72% изолятов синегнойной палочки к различным фаговым препаратам [8–11]. Отсутствуют данные по чув-

ствительности к препаратам бактериофагов экстремально антибиотикорезистентных штаммов.

Так же, как и антибиотикотерапия, фаготерапия должна быть обоснована предварительным определением литической активности применяемых коммерческих бактериофагов. Быстрая смена циркулирующих в медицинских организациях штаммов-возбудителей инфекций, особенно ИСМП; формирование антифагового иммунитета у бактерий, структурные изменения биологических свойств рецепторов бактериальной клетки в ходе формирования антибиотикорезистентности – вот неполный перечень причин возможной фагорезистентности исследуемых бактерий.

Цель исследования: оценка эффективности коммерческих фаговых препаратов производителя НПО «Микроген» в отношении как чувствительных, так и устойчивых к антибиотикам клинических штаммов бактерий.

Материалы и методы

Для проведения микробиологического исследования был использован бактериологический метод. Клинический материал от больных (биоптат, отделяемое из раны, пунктат, кровь, плевральная жидкость, моча) поступал из различных отделений НМИЦ им. А.В. Вишневского в течение 1–2 ч после взятия материала. Выделение и идентификацию чистых культур, а также определение чувствительности бактерий к антибиотикам проводили согласно общепринятым методикам в микробиологической лаборатории.

В исследование было включено 5 комплексных фагов: «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (Н. Новгород), «Секстафаг» (Пермь), «Интестифаг» (Пермь), «Интестифаг» (Н. Новгород), «Колипротейный бактериофаг» (Н. Новгород) и монофаги «Клебсиеллезный бактериофаг» (Уфа), «Стафилококковый бактериофаг (Пермь), «Стафилококковый бактериофаг (Н. Новгород).

Фагочувствительность выделенных клинических штаммов определяли согласно методическим рекомендациям [12], методом «spot-test», с использованием плотной питательной среды Мюллера–Хинтон и с оценкой в «крестовой» системе. При литической активности «++++» или «+++» исследуемый штамм микроорганизма считался чувствительным к бактериофагу, «++» – зона лизиса с большим количеством колоний вторичного роста (более 15 колоний на месте капли) – штамм считался слабочувствительным, а бактериофаг низкоактивным, «+» – сплошной рост изолированных колоний бактерии на месте капли – штамм нечувствительный, бактериофаг низкоактивный, «-» – отсутствие литической активности лекарственного бактериофага.

Результаты исследования

Спектр литической активности поливалентных и моновалентных бактериофагов был изучен в отношении 350 штаммов бактерий, выделенных из материала больных с гнойно-септическими осложнениями хирургических и ожоговых ран. Среди этих штаммов 267 штаммов – грамотрицательные ферментирующие из семейства *Enterobacterales* (*E. coli*, *K. pneumoniae*), неферментирующие – *P. aeruginosa* и 83 штамма грамположительных бактерий – стафилококки

(52 штамма) и энтерококки (31 штамм). Все тестируемые штаммы бактерий были разделены на 2 группы: бактерии чувствительные и резистентные к разным группам антибиотиков.

Чувствительность микроорганизмов к действию фагов была различной и варьировала от 16% до 90% для всех изученных штаммов бактерий.

S. aureus. Литическая активность представленных коммерческих препаратов, содержащих специфические бактериофаги в отношении выделенных клинических изолятов, была высокой. Доля чувствительных к бактериофагам штаммов составила: 90% – для Пиофага и стафилококкового монофага (Н. Новгород), 86,6% – для ИНТЕСТИ (Н. Новгород) фага, 60% – для Секстафага, 56,6% – для стафилококкового монофага (Пермь), 50% – для Интести (Пермь). Среди клинических изолятов *S. aureus* не обнаружено штаммов, резистентных к Пиофагу и Интести (Н. Новгород) фагу. 38,7% штаммов *S. aureus* обладали перекрестной чувствительностью ко всем заявленным бактериофагам по сравнению с соответствующим показателем для *S. epidermidis* (6,4%). Выделенные антибиотикорезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) не обладали резистентностью к изученным фаговым препаратам, однако 9,8% из них явились слабочувствительными ко всем заявленным фагам.

S. epidermidis. Наибольшей литической активностью в отношении всех выделенных изолятов обладали коммерческие бактериофаговые препараты, приготовленные производственным объединением Института микробиологии и эпидемиологии (г. Нижний Новгород). Доля чувствительных штаммов составила: 81,9% – к Пиофагу, 76,6% – к поливалентному препарату Интести (Н. Новгород) и моновалентному стафилококковому бактериофагу (Н. Новгород). Наименьшей активностью в отношении *S. epidermidis* обладали Интестифаг (Пермь) и Секстафаг: доля чувствительных штаммов составила 19,1% и 28,5% соответственно. Среди штаммов, обладающих резистентностью к антибиотикам (в т.ч. MRSE-штаммы), 14,2% проявляли резистентность к Пиофагу, Интестифагу (Н. Новгород) и стафилококковому монофагу (Н. Новгород). Резистентность к коммерческим бактериофагам производства НПО «Биомед» (Пермь) была выше и составила 23,8% – для стафилококкового монофага и 33,3% – для Интестифага и Секстафага.

Enterococcus spp. Сравнительный анализ литической активности бактериофагов демонстрирует преимущества энтерококковых бактериофагов, входящих в состав коммерческих препаратов производства НПО Института эпидемиологии и микробиологии (Н. Новгород). Доля чувствительных штаммов *E. faecalis* составила 76,6% – к Пиофагу и Интестифагу (Н. Новгород) и 48% – к Интестифагу (Пермь). Среди небольшого количества штаммов *E. faecium* нами не обнаружено ни одного штамма, чувствительного к Интестифагу (Пермь), а доля чувствительных к Пиофагу и Интестифагу (Н. Новгород) составила 33,3% и 16% случаев соответственно.

P. aeruginosa. Сравнительный анализ активности бактериофагов в составе разных коммерческих бактериофагов в отношении тестируемой популяции *P. aeruginosa* показал наибольшую активность Секстафага (Пермь): 51,5% лизируемых культур *P. aeruginosa*, в отличие от Интестифага

(Пермь), Интестифага (Н. Новгород) и Пиофага (46,8%, 43,8%, 35,9% лизируемых культур соответственно). Все тестируемые штаммы обладали теми или иными механизмами резистентности к антибиотикам, из них 28 штаммов (43,7%) считались мультирезистентными (MDR – Multiple Drug Resistance штаммы) и 20 штаммов (31,3%) экстремально резистентными (XDR – Extensively Drug Resistance штаммы) к антибактериальным препаратам. Всего 8 мультирезистентных (MDR) (28,5%) и 2 – экстремально резистентных штаммов (XDR) (10%) обладали перекрестной чувствительностью ко всем заявленным коммерческим бактериофагам.

E. coli. Из всех протестированных поливалентных коммерческих бактериофагов наиболее активным в отношении бактериальных культур *E. coli* оказался колипротейный фаг (57,6% лизированных штаммов), наименее активным – Интестифаг (Пермь) (43,8% лизированных культур). Учитывая, что препарат Секстафаг содержит более высокую концентрацию активных фаговых частиц (10^6 по Аппельману, что соответствует титру 10^9 БОЕ на 1 мл), активность его была выше (51,9%), чем Пиофага (50,7%) и Интестифага (Н. Новгород) – 49,5% лизированных культур *E. coli*.

Уровень фагорезистентности в группе антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных штаммов *E. coli* был приблизительно одинаковым для следующих лекарственных бактериофагов: Интестифаг (Н. Новгород) – 41,4% и 41,6%; Интестифаг (Пермь) – 40% и 39%, Секстафаг – 40% и 41,4% соответственно группам. Штаммы *E. coli*, обладающие различными фенотипами резистентности к антибактериальным препаратам (58,6% штаммов всей изученной коллекции клинических штаммов), продемонстрировали наименьший уровень резистентности к Пиофагу (Н) – 37,2%, а антибиотикочувствительные штаммы *E. coli* – к колипротейному бактериофагу (33,3% резистентных культур)

K. pneumoniae. В отношении общей популяции выделенных штаммов *K. pneumoniae*, как антибиотикочувствительных, так и антибиотикорезистентных, литическая активность комбинированного Пиофага и моновалентного клебсиеллезного фага была приблизительно одинаковой (44,8% и 44,9% лизируемых штаммов соответственно). Наиболее активным действием в отношении выделенных культур обладал Секстафаг (47,4% лизированных культур). Однако для отдельно взятой группы антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных штаммов показатели фагочувствительности и фагорезистентности имели определенные различия. Так, для антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* уровень фагорезистентности к Пиофагу и моновалентному клебсиеллезному бактериофагу был низким и составил 25,8% соответственно, а уровень фагорезистентности к Секстафагу (высококонцентрированный препарат) был самым высоким (44%). В группе антибиотикочувствительных штаммов *K. pneumoniae* доля резистентных к Пиофагу штаммов составила 22,7%, к Секстафагу – 36,4%, к клебсиеллезному монофагу – 72,8%.

Обсуждение

Возникшая глобальная проблема резистентности бактерий к антибактериальным и химиотерапевтическим препа-

ратам заставляет обратиться к ряду альтернативных методов профилактики и лечения инфекционных заболеваний, среди которых особое место принадлежит вирулентным бактериофагам. На сегодняшний день в России использование фагов предусмотрено «Национальной Концепцией профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», утвержденной Главным государственным санитарным врачом РФ. Создание и использование препаратов бактериофагов в качестве альтернативы антибактериальным препаратам также предусмотрено и утверждено Правительством в «Комплексной программе развития биотехнологий в РФ на период до 2020 г».

Сегодня в промышленных масштабах бактериофагами занимаются три российских завода: ОАО «НПО «Микроген» в Нижнем Новгороде, Уфе, Перми. Не менее 30% производственных штаммов бактерий ежегодно обновляют. На сегодня «Микроген» производит 11 различных фаговых препаратов, которые используют для лечения распространенных бактериальных инфекций. Препараты бактериофагов выпускают в форме раствора, которые можно принимать *per os*, использовать для полоскания полости рта, орошений, аппликаций, клизм, спринцеваний, а также обработки ран [13].

В связи со сложностью разработки и длительностью внедрения в практику новых антимикробных препаратов, а также растущей множественной резистентностью к антибиотикам возбудителей бактериальных инфекций становится очевидной необходимость создания и применения комбинированных схем лечения бактериальных инфекций, в том числе с назначением лекарственных бактериофагов [14, 15]. Однако эффективность фаготерапии напрямую зависит не только от качества созданного препарата, но и его литической активности.

Отсутствие системного анализа чувствительности бактерий к вирионам, в том числе с учетом региональных особенностей, которые диктуются циркуляцией не только чувствительных к антибиотикам штаммов, но и антибиотикорезистентных, не позволяет обеспечить полную оценку эффективности фаготерапии.

Нами был проанализирован спектр фагочувствительности для 267 штаммов грамотрицательных и 82 штаммов грамположительных бактерий.

Как видно из полученных нами данных, грамположительные бактерии сохраняли высокую чувствительность к предложенным бактериофагам на уровне 46,1–84,3% случаев, в отличие от грамотрицательной микрофлоры – от 28,9 до 57,6% случаев. Полученные данные согласуются с данными как отечественных, так и некоторых зарубежных исследователей [16–18]. В работах отечественных и зарубежных исследователей, посвященных вопросам влияния использования литических фагов на биологическое разнообразие и адаптационные возможности условно-патогенных и патогенных бактерий в окружающей среде, было показано изменение спектра фагочувствительности грамотрицательных бактерий и сохранение такового у грамположительных [19–22].

Как известно, лизабельность культур бактерий находится в прямой зависимости от специфичности взаимодействия фаговых и клеточных рецепторов. В отличие от фагов грамотрицательных бактерий, фаги грамположительных бактерий в качестве первичных рецепторов используют тейхое-

вые кислоты клеточной стенки бактерий. Данные клеточные рецепторы практически всегда остаются свободными от экранирования их специфическими белками (например, белком А у *S. aureus*). Высокая консервативность участков тейхоевых рецепторов, высокая концентрация ионов Са, в условиях которых происходит взаимодействие рецепторов фага и клетки, обеспечивают соответствующие условия физико-химической связи для специфической адгезии и интеграции бактериофагов в клетку. При этом, в отличие от фагов грамотрицательных бактерий, фаги грамположительных кокков не нуждаются в адгезии к так называемым вторичным рецепторам клетки, необходимым для конформационных изменений белковых структур вируса, обеспечивающих процесс успешной интернализации и последующего размножения вирусных частиц.

Литическая активность заявленных препаратов бактериофагов была неоднозначной даже в отношении одного и того же штамма бактерий и могла выглядеть как высоко-, так и низкоактивной.

Низкая литическая активность комбинированных и монофагов, возможно, объясняется очень узкой специфичностью используемых фагов, когда инфекционность каждого отдельного вируса проявляется, как правило, в отношении только близкородственных штаммов бактерий, обладающих определенным сходным набором рецепторов. «Выживание» некоторых клеток бактериальных популяций при взаимодействии их с фагами, наблюдаемое нами в условиях *in vitro*, лишний раз подтверждает разнообразие жизненных циклов бактериофагов. Так, доказано, что иногда заведомо вирулентные фаги способны после размножения в клетке хозяина выходить из клетки почкованием, оставляя клетку жизнеспособной.

Чтобы расширить представление о сложившейся ситуации в популяциях циркулирующих штаммов бактерий и возможных вариантах их взаимодействия с вирусами, в группу анализируемых штаммов бактерий были включены как антибиотикочувствительные, так и антибиотикорезистентные штаммы бактерий. В группах грамотрицательных микроорганизмов, в отличие от грамположительных бактерий (стафилококков и энтерококков), литическая активность заявленных лекарственных фагов была различной. Так, в группе антибиотикорезистентных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* доля высокочувствительных клеток к фагам была выше, чем в группе антибиотикочувствительных.

В случае эмпирического назначения клебсиеллезного монофага лечение инфекции, вызванной штаммами *K. pneumoniae*, вряд ли будет успешным, поскольку данный препарат был неактивным в отношении 72,8% антибиотикочувствительных и 68% антибиотикорезистентных штаммов. Для выяснения причины низкой литической активности клебсиеллезного монофага необходимо проведение дополнительных микробиологических и генетических исследований.

Высококонцентрированные лекарственные препараты бактериофагов (Пиофаг и Секстафаг) оказались наиболее эффективны в отношении гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, которые обладали определенными механизмами резистентности к антибиотикам.

Уровень фагорезистентности *P. aeruginosa* также был высок и составил от 43 до 62,5% случаев. Особое внимание

привлекают высокорезистентные штаммы *P. aeruginosa* (20,8% мульти- и панрезистентные к антибиотикам штаммы), сохраняющие перекрестную чувствительность ко всем заявленным лекарственным бактериофагам. Данные штаммы микроорганизмов, в козволюции которых место вируса остается лидирующим, возможно, также должны быть включены в коллекции микроорганизмов, представляющих интерес при адаптивном обновлении коммерческих лекарственных бактериофагов.

Нами обнаружено, что все штаммы *E. coli*, как антибиотикочувствительные, так и антибиотикорезистентные, проявляющие резистентность к колипротейному бактериофагу, обладали перекрестной резистентностью и к другим анализируемым комплексным лекарственным колибактериофагам. В связи с этим определение чувствительности к колипротейному фагу в лабораториях может служить скрининговым тестом по определению чувствительности к различным колифагам.

Было установлено, что коагулазоотрицательные стафилококки обладали более низким уровнем чувствительности к заявленным лекарственным бактериофагам, чем коагулазоположительные. Возможно, это объясняется различием в строении тейхоевых кислот, которые являются основным субстратом для рецепции бактериофагов и успешного проникновения в клетку с сохранением потенциала литического фага.

Штаммы *S. aureus*, обладающие резистентностью ко всем антибиотикам пенициллинового ряда (метициллинрезистентные штаммы – MRSA), демонстрировали 100% чувствительность к заявленным комбинированным и моновалентным лекарственным бактериофагам, в отличие от MRSE-штаммов (метициллинрезистентный *S. epidermidis*). Поскольку отсутствует генетическая характеристика выявленных резистентных штаммов MRSA, можно лишь предполагать о возможных механизмах 100% литической активности фагов. Так, проведенные различными авторами исследования по метаболомике и протеомике микроорганизмов показали, что для ослабления действия на микробную клетку антибиотиков и иных неблагоприятных воздействий в клетках патогенного стафилококка могут происходить адаптивные изменения метаболических процессов. Они считают, что у MRSA метаболическая адаптация детерминирована генетическими перестройками в определенных генах (SCCmecA), вследствие чего снижается антибактериальная активность препарата, но биосинтез пептидогликана, играющего определенную роль в адгезии фага к клетке, не нарушается [24, 25]. По-видимому, данные изменения способствуют освобождению дополнительных клеточных рецепторов на поверхности клеточной мембраны для бактериофага (увеличение плотности рецепторов для фагов за счет блокады связи рецепторов с антибиотиком), способствуя формированию высокоавидной и высокоаффинной связи фагов с клетками MRSA.

MRSA-штаммы характеризуются замедленными процессами клеточного роста, и формируемые ими биопленки имеют низкую биомассу по сравнению с биопленками, образованными MSSA. В составе биопленки развиваются варианты малых колоний (small colony variants, SCV) с различной метаболической активностью, с различными метаболитами.

ческими фенотипами, адаптированными к разным стрессовым воздействиям. Согласно опубликованным научным данным, процесс адгезии специфического бактериофага на рецепторах клеток, подобных MRSA может сопровождаться активацией специфических белков капсида вируса [26–28]. Белки, выполняя функцию протеолитических ферментов, способствуют проникновению в клетку, при необходимости разрушая внеклеточный матрикс. Данные обстоятельства способствуют успешной интернализации фага в клетку, сохраняя статус клетки как высокочувствительной к литическому действию вируса.

Несмотря на идентичность состава комбинированных фагов, литическая активность для некоторых видов микроорганизмов была различной, в зависимости от производственной платформы изготовления. Так, наибольшую литическую активность в отношении грамположительных микроорганизмов (стафилококков и энтерококков) проявляли лекарственные бактериофаги, приготовленные производственным объединением Института микробиологии и эпидемиологии г. Нижний Новгород, а в отношении грамотрицательных бактерий – бактериофаги производственной площадки г. Пермь.

Большую проблему в оценке эффективности лекарственных бактериофагов представили штаммы бактерий, демонстрирующие литическую активность препаратов на «++», «+» креста. Все эти штаммы бактерий, согласно регламентирующему документу, были отнесены к группе «нечувствительных». Однако при проведении нами дополнительных микробиологических исследований было установлено, что колонии бактерии, растущие в зоне литического пятна, не всегда оставались жизнеспособными, и при пересеве культуры роста таких популяций не наблюдалось. Выявленные признаки свидетельствуют о гетерогенности изучаемых популяций и требуют дополнительного изучения процессов взаимодействия фагов и бактерий не только в условиях *in vitro*, но и в условиях *in situ*.

В создавшейся ситуации с трудностями в лечении инфекций внимание исследователей привлекают не только антибиотикорезистентные, но и фагорезистентные штаммы бактерий. На сегодняшний день известно 13 механизмов резистентности бактерий к вирусам, среди которых выделяют как природные, так и приобретенные [29–32]. Как свидетельствуют ряд исследовательских работ [33, 34], в т.ч. и полученные нами данные, строгой корреляции между устойчивостью штаммов к бактериофагам и их устойчивостью к антибактериальным препаратам, а также корреляции между устойчивостью штаммов к бактериофагам и принадлежностью бактерий к определенному клональному комплексу не обнаружено.

Учитывая высокую гетерогенность популяций выделенных штаммов антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных бактерий, демонстрирующих изменение спектра фагочувствительности, возникает необходимость сбора и создания коллекций микроорганизмов для более детального изучения биологических свойств фагорезистентных микроорганизмов.

Следуя рациональному принципу фаготерапии, полученные нами данные еще раз подтверждают необходимость регулярного мониторинга за изменением чувствительности

микроорганизмов к предлагаемым лекарственным фаговым препаратам.

Заключение

Спектр литической активности заявленных коммерческих лекарственных бактериофагов в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий различен.

Лекарственные фаги оказались высокоактивными в отношении грамположительных кокковых микроорганизмов и менее активными в отношении грамотрицательных бактерий.

В группе грамотрицательных бактерий антибиотикорезистентных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* доля высокочувствительных клеток к фагам была выше, чем в группе антибиотикочувствительных.

Высокорезистентные штаммы *P. aeruginosa* (20,8% мульти- и панрезистентные к антибиотикам штаммы) сохраняют перекрестную чувствительность ко всем заявленным лекарственным бактериофагам.

Для подавления жизнеспособности гипермукоидных штаммов (в т.ч. антибиотикорезистентных – MDR и XDR штаммов) *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* рекомендуется применять высококонцентрированные лекарственные бактериофаги

Гетерогенность выявляемых популяций бактерий требует актуализации вопросов мониторингования фагочувствительности выявляемых изолятов, что поможет усилить эффективность антибактериального лечения.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Зуева ЛП, Асланов БИ, Акимкин ВГ. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике ИСМП. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2014;1(74):43-48.
- Ильина ТС, Толордава ЭР, Романова ЮМ. Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019;3:103-112.
- Дрюккер ВВ, Горшкова АС. Бактериофаги и их функционирование в биопленках. Серия «Биология. Экология». 2012;5(3):8-16.
- Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 3;104(27):11197-202. DOI: 10.1073/pnas.0704624104
- Вакарина АА, Катаева ЛВ, Степанова ТФ. Влияние бактериофагов на чувствительность условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. Журнал микробиологии. 2019;2:3-7.
- Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. La "synergie phages-

- antibiotiques": Un enjeu pour la phagothérapie [The discovery of a natural phenomenon, "Phage-Antibiotic Synergy". Implications for phage therapy]. Med Sci (Paris). 2008 May;24(5):449-51. (In French). DOI: 10.1051/medsci/2008245449
7. Саканделидзе ВМ. Комплексное применение специфических фагов и антибиотиков при различных инфекционных аллергиях. Врачебное. Дело. 1991;3:60-62.
8. Тапальский ДВ, Козлова АИ. Чувствительность к препаратам бактериофагов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности. Проблемы здоровья и экологии. 2018;4:56-62.
9. Катаева ЛВ, Вакарина АА, Степанова ТФ, Степанова КБ, Бычкова ЛА. Литическая активность бактериофагов в отношении возбудителей острых кишечных инфекций. Здоровье населения и среда обитания. 2015;3(264):39-42.
10. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. Lancet Infect Dis. 2019 Jan;19(1):35-45. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1
11. Тапальский ДВ. Чувствительность госпитальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* к препаратам для фаготерапии. Вестник ВГМУ. 2018;17(2):47-54.
12. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике: Федеральные Клинические Рекомендации. 2014.
13. Сайт ФГУН НПО «Микроген». Режим доступа: <http://www.bacteriophage.ru/press/news/na-kongresse-rossijskogo-obshchestvarinologov-v-nizhnem-novgorodetmetilipreimushchestva-bakterio/>
14. Костюкевич ОИ. Применение бактериофагов в клинической практике: эпоха Возрождения. РМЖ. 2015;21:1258-1262.
15. Падруль ММ, Кобаидзе ЕГ, Олина АА, Садыкова ГК. «Ренессанс» фаготерапии воспалительных процессов. Современные проблемы науки и образования. 2015;1:1358-1370.
16. Красильников ИВ, Лыско КА, Лобастова АК. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: современное состояние применения и производства. Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. 2010;4:9-11.
17. Захаренко СМ. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее. Журнал Медицинский Совет. 2013;10:72-74. DOI: 10.21518/2079-701x-2013-10-72-75
18. Бахрушина ЕО, Анурова МН, Алешкин АВ, Демина НБ, Краснюк ИИ, Пятигорская НВ и др. Современные тенденции применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов. Вестник РАМН. 2021;76(4):351-360.
19. Лашин СА, Матушкин ЮГ, Сулов ВВ, Колчанов НА. Эволюционные тренды в системах «прокариотическое сообщество» и «прокариотическое сообщество-фаг». Генетика. 2011;47(12):1676-1685.
20. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. FEMS Microbiol Lett. 2016 Feb;363(4):fnw002. DOI: 10.1093/femsle/fnw002
21. Storms ZJ, Sauvageau D. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. Virology. 2015 Nov;485:355-62. DOI: 10.1016/j.virol.2015.08.007
22. Аршба ИМ, Орлов СВ, Рубальский Черкашина ЕВ. Влияние применения литических бактериофагов на динамику фагочувствительности патогенных и условно-патогенных бактерий на индивидуальном и групповом уровне на модели обезьян. Материалы четвертой научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». 24-26 сентября 2018, г. Нижний Новгород.
23. Чанышева РФ, Ковалишена ОВ. Состояние фагочувствительности стафилококков – возбудителей инфекций в медицинских организациях нижегородской области РФ. Медицинский Альманах. 2014;2:32-35.
24. González S, Fernández L, Gutiérrez D, Campelo AB, Rodríguez A, García P. Analysis of Different Parameters Affecting Diffusion, Propagation and Survival of Staphylococci in Bacterial Biofilms. Front Microbiol. 2018 Sep 28;9:2348. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02348
25. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Sep;68(3):560-602, table of contents. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
26. Гордина ЕМ, Божкова СА, Смирнова ЛН. Влияние бактериофагов на биопленки *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией. КМАХ. 2022;24(3):283-288.
27. Шевченко ТН. Влияние стафилококкового бактериофага на процесс пленкообразования штаммов золотистого стафилококка. Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2019;8(1):71-77.
28. Алмагамбетов КХ. Молекулярная биология *Staphylococcus aureus*. Astana Medical Journal. 2021;1(107):61-68.
29. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol. 2010 May;8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315
30. Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, Cohen O, Doron S, Charpak-Amikam Y, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. EMBO J. 2015 Jan 13;34(2):169-83. DOI: 10.15252/embj.201489455
31. van Houte S, Buckling A, Westra ER. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. Microbiol Mol Biol Rev. 2016 Jul 13;80(3):745-63. DOI: 10.1128/MMBR.00011-16
32. Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. Science. 2018 Mar 2;359(6379):eaar4120. DOI: 10.1126/science.aar4120
33. Купцов НС, Корниенко МА, Городничев РБ, Данилов ДИ, Малахова МВ, Парфенова ТВ, и др. Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE Bulletin of RSMU Vestnikrgmu.ru 2020;3:18-24. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.029
34. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol. 2010 May;8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315

References

1. Zueva LP, Aslanov BI, Akimkin VG. Modern view on the role of bacteriophages in the evolution of hospital strains and prevention of ISMP. Epidemiology and Vaccine Prevention. 2014;1(74):43-48. (In Russian).
2. Il'ina TS, Tolordava ER, Romanova YuM. A look at phage therapy 100 years after the discovery of bacteriophages. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2019;3:103-112. (In Russian).
3. Drukker VV, Gorshkova AS. Bacteriophages and their functioning in biofilms. Series "Biology. Ecology". 2012;5(3):8-16. (In Russian).
4. Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 3;104(27):11197-202. DOI: 10.1073/pnas.0704624104
5. Vakarina AA, Kataeva LV, Stepanova TF. Influence of bacteriophages on the sensitivity of opportunistic bacteria to antibacterial drugs. Journal of Microbiology. 2019;2:3-70. (In Russian).
6. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. La "synergie phages-antibiotiques": Un enjeu pour la phagothérapie [The discovery of a natural phenomenon, "Phage-Antibiotic Synergy". Implications for phage therapy]. Med Sci (Paris). 2008 May;24(5):449-51. (In French). DOI: 10.1051/medsci/2008245449
7. Sakandelidze VM. Complex application of specific phages and antibiotics in various infectious allergoses. Medical services. A business. 1991;3:60-62. (In Russian).
8. Tapalsky DV, Kozlova AI. Sensitivity to preparations of bacteriophages of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with different levels of antibiotic resistance. Health and environmental issues. 2018;4:56-62. (In Russian).
9. Kataeva LV, Vakarina AA, Stepanova TF, Stepanova KB, Bychkova LA. Lytic activity

- of bacteriophages against pathogens of acute intestinal infections. Population health and habitat. 2015;3(264):39-42. (In Russian).
10. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jan;19(1):35-45. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1
11. Tapalsky DV. Sensitivity of hospital isolates *Pseudomonas aeruginosa* to preparations for phage therapy. *Bulletin of VSMU*. 2018;17(2):47-54. (In Russian).
12. Rational use of bacteriophages in medical and anti-epidemic practice: Federal Clinical Guidelines. 2014.
13. Sait FGUN NPO «Mikrogen». Available at: <http://www.bacteriofag.ru/press/news/na-kongresse-rossiyskogo-obshchestvarinologov-v-nizhnem-novgorode-tmetilipreimushchestva-bakterio/> (In Russian).
14. Kostyukovich OI. The use of bacteriophages in clinical practice: the Renaissance Era. *RMJ*. 2015;21:1258-1262. (In Russian).
15. Padrul MM, Kobaidze EG, Olina AA, Sadykova GK. "Renaissance" of phagotherapy of inflammatory processes. *Modern problems of science and education*. 2015;1:1358-1370. (In Russian).
16. Krasilnikov IV, Lysko KA, Lobastova AK. Therapeutic and prophylactic preparations of bacteriophages: current state of application and production. *Medical alphabet. Epidemiology and sanitation*. 2010;4:9-11. (In Russian).
17. Zakharenko C M. Bacteriophages: modern aspects of application, prospects for the future p. 72-74. DOI: 10.21518/2079-701x-2013-10-72-75 (In Russian).
18. Bakhrushina EO, Anurova MN, Aleshkin AV, Demina NB, Krasnyuk II, Pyatigorskaya NV, et al. Modern trends in the use and development of medicinal preparations of bacteriophages. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2021;76(4):351-360. (In Russian).
19. Lashin CA, Matushkin YuG, Suslov VV, Kolchanov NA. Evolutionary trends in the "prokaryotic community" and "prokaryotic community-phage" systems. *Genetics*. 2011;47(12):1676-1685 (In Russian).
20. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Feb;363(4):fnw002. DOI: 10.1093/femsle/fnw002
21. Storms ZJ, Sauvageau D. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. *Virology*. 2015 Nov;485:355-62. DOI: 10.1016/j.virol.2015.08.007
22. Arshba IM, Orlov SV, Rubal'skii Cherkashina EV. Influence of the use of lytic bacteriophages on the dynamics of phage sensitivity of pathogenic and opportunistic bacteria at the individual and group level on the monkey model. *Materials of the fourth scientific and practical conference with international participation "Bacteriophages. Theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry"*. September 24-26, 2018, Nizhny Novgorod, Russia. (In Russian).
23. Chanysheva RF, Kovalishena OV. State of phage sensitivity of staphylococci-infectious agents in medical organizations of the Nizhny Novgorod region of the Russian Federation. *Medical Almanac*. 2014;2:32-35. (In Russian).
24. González S, Fernández L, Gutiérrez D, Campelo AB, Rodríguez A, García P. Analysis of Different Parameters Affecting Diffusion, Propagation and Survival of Staphylophages in Bacterial Biofilms. *Front Microbiol*. 2018 Sep 28;9:2348. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02348
25. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Sep;68(3):560-602, table of contents. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
26. Gordina EM, Bozhkova SA, Smirnova LN. Influence of bacteriophages on biofilms isolated from patients with orthopedic infection. *CMAJ*. 2022;24(3):283-288. (In Russian).
27. Shevchenko TN. Influence of staphylococcal bacteriophage on the process of film formation of *Staphylococcus aureus* strains. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2019;8(1):71-77. (In Russian).
28. Almagambetov KH. Molecular biology of *Staphylococcus aureus*. *Astana Medical Journal*. 2021;1(107):61-68. (In Russian).
29. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010 May;8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315
30. Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, Cohen O, Doron S, Charpak-Amikam Y, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J*. 2015 Jan 13;34(2):169-83. DOI: 10.15252/embj.201489455
31. van Houte S, Buckling A, Westra ER. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Jul 13;80(3):745-63. DOI: 10.1128/MMBR.00011-16
32. Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*. 2018 Mar 2;359(6379):eaar4120. DOI: 10.1126/science.aar4120
33. Kuptsov NS, Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, et al. Effectiveness of bacteriophage preparations against ESKAPE pathogens *Bulletin of RSMU Vestnikrgmu.ru* 2020; 3:18-24. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.029.(In Russian).
34. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010 May;8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315
-
- Информация о соавторах:**
Терехова Раиса Петровна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией профилактики и лечения бактериальных инфекций лаборатория профилактики и лечения бактериальных инфекций ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
ORCID: 0000-0002-4622-1429
- Прудникова Светлана Александровна, врач бактериолог лаборатории профилактики и лечения бактериальных инфекций ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
-
- Information about co-authors:**
Raissa P. Terekhova, MD, PhD, Head of the Laboratory for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections, A.V.Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery
ORCID: 0000-0002-4622-1429
- Svetlana A. Prudnikova, bacteriologist of the laboratory of prevention and treatment of bacterial infections, A.V.Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery

Влияние низина на ростовые параметры и биопленкообразующую активность штаммов *Enterococcus faecalis*, изолированных из ротовой полости

Д.С.Пантелеев¹, А.П.Годовалов¹, М.В.Яковлев²

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера» Минздрава России, Пермь, Российская Федерация;

²ГБУЗ ПК «Городская стоматологическая поликлиника №1», Пермь, Российская Федерация

В настоящее время актуален поиск антимикробных препаратов, пригодных для использования в стоматологической практике, поскольку в патогенезе большинства заболеваний задействованы микробные ассоциации. Имеющийся арсенал антибиотиков обладает рядом негативных моментов. Среди представителей оральной микрофлоры существенное клиническое значение имеют *Enterococcus faecalis*.

Цель. Изучение влияния низина на параметры роста и формирование биопленки штаммами *Enterococcus faecalis*, изолированными из ротовой полости.

Материалы и методы. Изучали изменение параметров роста 15 клинических штаммов *E. faecalis* под влиянием низина в концентрации 1,25 и 2,5 мг/мл. Оценивали влияние низина на биомассу пленок, сформированных *E. faecalis*, а также жизнеспособность микроорганизмов в пленке, обработанной низином.

Результаты. Установлено, что низин обладает антимикробной активностью, снижает ростовые характеристики *E. faecalis*. Однако не оказывает влияния на сформированную пленку клиническими штаммами, что обеспечивает выживание и в дальнейшем восстановление популяции бактерий.

Заключение. В целом низин обладает антимикробной активностью, однако в клинической практике необходимо использование комбинации низина с биопленкоразрушающими веществами.

Ключевые слова: *Enterococcus faecalis*, биопленка, низин, лантибиотик, фаза адаптации, кинетика роста, жизнеспособность клеток

Для цитирования: Пантелеев Д.С., Годовалов А.П., Яковлев М.В. Влияние низина на ростовые параметры и биопленкообразующую активность штаммов *Enterococcus faecalis*, изолированных из ротовой полости. Бактериология. 2025; 10(1): 71–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-71-74

Effect of nisin on growth parameters and biofilm-forming activity of *Enterococcus faecalis* strains isolated from the oral cavity

D.S.Panteleev¹, A.P.Godvalov¹, M.V.Yakovlev²

¹E.A.Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation;

²City Dental Polyclinic No 1, Perm, Russian Federation

Currently, the search for antimicrobial agents suitable for use in dentistry is relevant, since microbial associations are involved in the pathogenesis of most diseases. The available arsenal of antibiotics has a number of negative aspects. Among the representatives of oral microflora *Enterococcus faecalis* are of clinical importance.

Objective. Was to investigate the effect of nisin on growth parameters and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from the oral cavity.

Materials and methods. Changes in growth parameters of 15 clinical strains of *E. faecalis* under the influence of nisin 1.25 and 2.5 mg/ml were studied. The effect of nisin on the biomass of films formed by *E. faecalis* and the viability of microorganisms in the film treated with nisin was evaluated.

Results. It was found that nisin has antimicrobial activity, reduces growth characteristics of *E. faecalis*. However, it has no effect on the formed film by clinical strains, which ensures the survival and further recovery of the bacterial population.

Conclusion. In general, nisin has antimicrobial activity, but in practical practice it is necessary to create a combined preparation with an antibiofilm-destroying component.

Key words: *Enterococcus faecalis*, biofilm, nisin, lantibiotic, adaptation phase, growth kinetics, cell viability

For citation: Panteleev D.S., Godvalov A.P., Yakovlev M.V. Effect of nisin on growth parameters and biofilm-forming activity of *Enterococcus faecalis* strains isolated from the oral cavity. Bacteriology. 2025; 10(1): 71–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-71-74

Для корреспонденции:

Пантелеев Данил Станиславович, врач-ординатор ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера» Минздрава России

Адрес: 614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26

Статья поступила 14.09.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Danil S. Panteleev, resident physician, E.A.Wagner Perm State Medical University

Address: 26 Petropavlovskaya str., Perm, 614990, Russian Federation

The article was received 14.09.2024, accepted for publication 31.03.2025

Распространенность стоматологических заболеваний среди всех возрастных групп достигает 100%, а патология твердых тканей зубов и слизистой оболочки полости рта занимает лидирующие позиции [1]. Общеизвестно, что среди основных факторов, способствующих развитию заболеваний полости рта, существенную долю составляют микроорганизмы, колонизирующие слизистую оболочку ротовой полости и твердые ткани зубов. Например, такие бактерии, как *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* (78%) и *Staphylococcus epidermidis* (3%), играют ключевую роль в образовании зубного налета и развитии кариеса зубов [2]. Согласно исследованиям Н.Е.Баранцевич и соавт., *Enterococcus faecalis* колонизирует ткани пародонта и слизистую оболочку полости рта примерно у 20% здоровых лиц, а при присоединении инфекционно-воспалительных заболеваний встречается у 68% пациентов [3]. По своей природе микробная ассоциация в процессе жизнедеятельности образует биопленку, которая защищает ее от воздействия факторов экзотической среды, в первую очередь обладающих антимикробной активностью [4].

В случае отсутствия своевременного и качественного лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами, развиваются осложнения системного характера [5]. Например, микроорганизмы полости рта могут обуславливать такие заболевания сердечно-сосудистой системы, как эндокардит [6, 7].

В настоящее время неотъемлемой частью борьбы с инфекционно-воспалительными заболеваниями бактериальной этиологии являются антибиотики. Однако при длительном применении таких препаратов существует риск развития резистентности к ним у микроорганизмов [8], а также других побочных негативных явлений [9]. Более того, нерациональное употребление антибиотиков затрудняет их подбор для лечения других заболеваний. Именно поэтому актуален вопрос о поиске и создании препаратов, не приводящих к развитию устойчивости бактерий, а также других негативных эффектов на организм человека [10, 11]. Среди таких препаратов заслуживают внимания бактериоцины.

При анализе фармацевтического рынка препаратов на основе полипептидных лантибиотиков для применения в стоматологической практике не обнаружилось. Поэтому создание препарата на основе низина с выраженным антимикробным действием представляет интерес.

Целью исследования явилось изучение влияния низина на параметры роста и формирование биопленки штаммами *Enterococcus faecalis*, изолированными из ротовой полости.

Материалы и методы

В исследовании использовали 15 штаммов *Enterococcus faecalis*, изолированных из ротовой полости. Все исследования проводили в повторях. На каждый штамм использовали не менее трех повторов. Для изучения кинетики роста штаммов использовали их культивирование в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Влияние низина оценивали при добавлении в питательную среду бактериоцина в концентрациях 1,25 и 2,5 мг/мл. В контрольные пробы вносили аналогичный объем МПБ. В отдельной серии экспериментов изучали восстановление клеточной популяции энтерококков после обработки

предварительно выращенной их биопленки низином в течение 20 минут при 37°C.

Параметры роста определяли путем ежечасного измерения оптической плотности культуральной жидкости в течение 24 ч при длине волны 600 нм на спектрофотометре PowerWave X (США). Оценивали длительность фазы адаптации микроорганизмов, скорость их роста. Для определения численности жизнеспособных клеток вычисляли площадь под кривой роста штаммов.

В планшетах формировали биопленки, культивирование которых осуществляли при 37°C в течение 24 ч с последующей окраской по методике О'Тооле, 2011.

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, t-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции. Результаты проведенных экспериментов представлены в виде среднего арифметического и его ошибки ($M \pm m$).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали, что при культивировании в жидкой питательной среде (МПБ) низин статистически значимо увеличивал продолжительность лаг-фазы ($p = 0,002$). Установлено, что в его отсутствие фаза адаптации в среднем длилась $0,25 \pm 0,03$ ч, а в образцах с концентрацией 1,25 мг/мл низин удлинял лаг-фазу в среднем до $13,6 \pm 0,8$ ч. При повышении концентрации до 2,5 мг/мл низин статистически значимо увеличивал фазу адаптации в среднем до 21 ± 2 ч ($p = 0,013$). Вместе с тем нами была выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между дозой препарата и длительностью начальной фазы роста штаммов *E. faecalis* ($r = 0,98$).

В процессе исследования скорости роста бактерий было установлено, что низин статистически значимо уменьшает этот параметр по сравнению с контрольными пробами. Например, с $0,09 \pm 0,001$ до $0,029 \pm 0,005$ у.е./ч при концентрации 1,25 мг/мл ($p = 0,004$). Выявлена обратная дозозави-

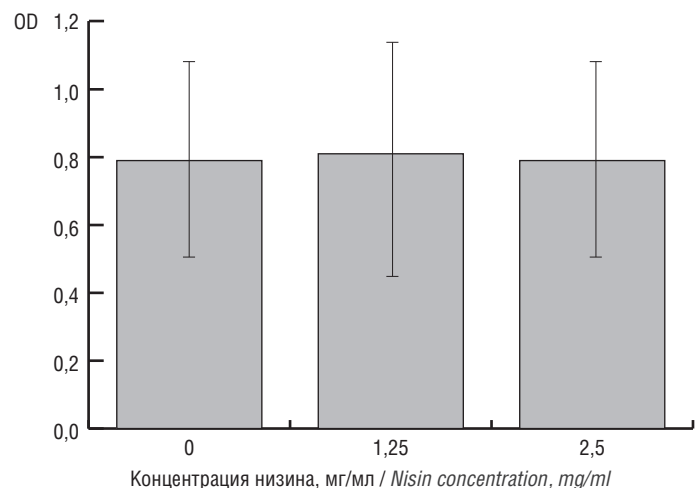


Рис. 1. Влияние низина на биомассу зрелой пленки штаммов *Enterococcus faecalis*: OD – оптическая плотность раствора кристаллического фиолетового, экстрагированного из окрашенной биопленки. Данные представлены в виде $M \pm m$.

Fig. 1. Effect of nisin on the biomass of mature *Enterococcus faecalis* strains: OD is the optical density of the crystal violet solution extracted from the stained biofilm. Data presented as $M \pm m$.

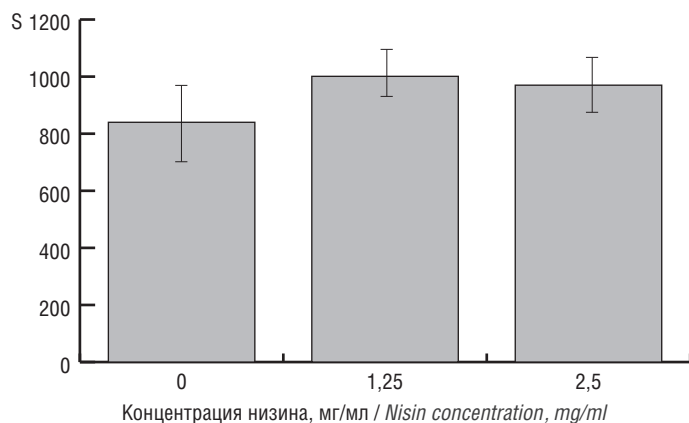


Рис. 2. Численность жизнеспособных клеток штамма *Enterococcus faecalis* после обработки зрелой биопленки низином. S – условные единицы площади под кривыми роста штамма. Данные представлены в виде $M \pm m$.

Fig. 2. The number of viable cells of the *Enterococcus faecalis* strain after treatment of mature biofilm with nisin. S – conventional units of area under the strain growth curves. Data are presented as $M \pm m$.

симая связь между повышением концентрации низина и скоростью роста штаммов ($r = -0,95$).

Выявлено, что низин статистически значимо подавляет жизнеспособность клеток *E. faecalis*. Площадь под кривой роста штаммов в МПБ без низина составила $574,83 \pm 74,54$ у.е., при внесении низина в концентрации 1,25 мг/мл – $278,21 \pm 30,08$ у.е. ($p = 0,018$), 2,5 мг/мл – $214,09 \pm 17,30$ у.е. ($p = 0,011$). При этом наблюдается обратная корреляционная связь ($r = -0,93$).

По своему характеру микробные консорциумы в полости рта находятся в бактериальных пленках, что добавляет обязательное требование к препаратам, применяемым в стоматологии в виде антибиопленочного эффекта. Нами было показано, что низин не оказывает влияния на толщину зрелой биопленки, сформированной штаммами *E. faecalis* (рис. 1).

Кроме этого, важно оценить выживаемость штаммов энтерококков, находящихся в биопленке, после ее обработки низином. Было установлено, что такие штаммы медленно адаптируются, длительность их лаг-фазы составила $3,4 \pm 0,25$ ч ($p = 0,001$ к пробам без низина).

Выявлена прямая корреляционная дозозависимая связь концентрации бактериоцина и длительности лаг-фазы ($r = 0,92$). Скорость роста штаммов из биопленки, обработанной низином, существенно не отличалась от таковой для штаммов, выращенных из биопленки, не обработанной препаратом ($0,10 \pm 0,03$ у.е./ч; $p = 0,41$). При этом энтерококки восстанавливали численность жизнеспособных клеток до уровня, сопоставимого в пробах без низина. Так, после обработки биопленки энтерококков низином в концентрации 1,25 мг/мл рост штамма возобновился, а площадь под кривой составила $999,99 \pm 32,7$ у.е. ($p = 0,08$), при 2,5 мг/мл – $979,04 \pm 38,97$ у.е. ($p = 0,36$), в пробах без низина – $832,49 \pm 109,24$ у.е. ($p = 0,13$) (рис. 2). Полученные данные указывают, что низин не оказывает значимого эффекта на бактерии, находящиеся в биопленке, и после завершения экспозиции и промывки планшет с последующим добавлением свежей питательной среды наблюдается восстановление роста штаммов.

Закключение

Таким образом, экспериментально показано, что низин оказывает ингибирующее влияние на параметры роста клинических штаммов *E. faecalis* в зависимости от концентрации, что проявляется увеличением фазы адаптации микроорганизмов, значительным снижением их скорости роста и уменьшением жизнеспособности штаммов. Однако низин не оказывает антибиопленочного эффекта, что приводит к восстановлению популяции клеток спустя 3,5 ч после его краткосрочного воздействия. Такое явление можно объяснить тем, что в структуре зрелой биопленки имеются экзополисахариды, которые не позволяют проникнуть бактериоцину к клеткам-персистерам и оказать на них влияние. Решением в подобной ситуации может быть применение комбинированного с низином препарата, который, помимо влияния на энтерококки, будет оказывать антибиопленочное действие.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Сафиуллин АА. Эпидемиологические аспекты основных стоматологических заболеваний в Челябинской области: монография. Издательский дом Академии Естествознания, 2016.
2. Пестов АЮ, Панченко АВ. Колонизация полости рта стафилококками при пародонтите. Вестник ВолГМУ. 2011;4(40):62-65.
3. Баранцевич НЕ, Орехова ЛЮ, Баранцевич ЕП. Роль *Enterococcus faecalis* при апикальном периодонтите. Пародонтология. 2021;26(4):275-283. DOI: 10.33925/1683-3759-2021-26-4-275-283
4. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control. 2019 May; 16:8:76. DOI: 10.1186/s13756-019-0533-3
5. Годовалов АП, Степанов МС, Яковлев МВ, Кобзаренко ЕЕ, Батог КА. Определение биопленкообразующей активности микроорганизмов на синтетических полимерных материалах. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(12):758-761. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-12-758-761
6. Годовалов АП, Карпунина ТИ. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(10):632-634. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-10-632-634
7. Сабуров СК, Тураев НГ. Оценка взаимодетерминированности стоматологических и системных заболеваний. Вестник Авиценны. 2013;4(57):125-129.
8. Lockhart PB, Durack DT. Oral microflora as a cause of endocarditis and other distant site infections. Infect Dis Clin North Am. 1999 Dec;13(4):833-50. DOI: 10.1016/s0891-5520(05)70111-2
9. Крючков ДЮ, Крючкова ОН, Романенко ИГ, Джерелей АА, Горобец СМ. Состояние полости рта и стоматологические вмешательства как фактор риска инфекционного эндокардита. Особенности профилактики. Крымский терапевтический журнал. 2020;3:80-83.

10. Черненко ТВ, Годков МА. «Проблемные» полирезистентные бактерии – возбудители внутрибольничных инфекций у пациентов в критических состояниях (обзор литературы). Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В.Склифосовского. 2015;3:30-35.
11. Sultan AA, Mallen C, Muller S, Hider S, Scott I, Helliwell T, et al. Antibiotic use and the risk of rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. BMC Med. 2019 Aug 7;17(1):154. DOI: 10.1186/s12916-019-1394-6

References

1. Safiullin AA. Epidemiologicheskie aspekty osnovnykh stomatologicheskikh zabolevaniy v chelyabinskoy oblasti: monografiya. Izdatel'skii dom Akademii Estestvoznaniya. 2016. (In Russian).
2. Pestov AYU, Panchenko AV. Colonization of oral cavity by staphylococci in parodontitis. Journal of Volgograd State Medical University. 2011;4(40):62-65. (In Russian).
3. Barantsevitch NE, Orekhova LY, Barantsevitch EP. The role of Enterococcus faecalis in apical periodontitis. Parodontologiya. 2021;26(4):275-283. DOI: 10.33925/1683-3759-2021-26-4-275-283 (In Russian).
4. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control. 2019 May; 16;8:76. DOI: 10.1186/s13756-019-0533-3
5. Godovalov AP, Stepanov MS, Yakovlev MV, Kobzareno EE, Batog KA. Determination of biofilm forming activity of microorganisms on synthetic polymeric materials. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2019;64(12):758-761. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-12-758-761 (In Russian).
6. Godovalov AP, Karpunina TI. The determination of biofilm composition of gram-positive bacteria. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2019;64(10):632-634. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-10-632-634 (In Russian).

7. Saburov SK, Turaev NG. Evaluation of interdetermination of dental and systemic diseases. Avicenna Bulletin. 2013;4(57):125-129. (In Russian).
8. Lockhart PB, Durack DT. Oral microflora as a cause of endocarditis and other distant site infections. Infect Dis Clin North Am. 1999 Dec;13(4):833-50. DOI: 10.1016/s0891-5520(05)70111-2
9. Kryuchkov DY, Kryuchkova ON, Romanenko IG, Dzhereley AA, Gorobets SM. The condition of the oral cavity and dental interventions as a risk factor for infectious endocarditis. Features of prevention. Crimean Journal of Internal Diseases. 2020;3:80-83. (In Russian).
10. Chernenkaya TV, Godkov MA. The "challenging" multidrug-resistant pathogens of nosocomial infections in critically ill patients (a literature review). Russian Sklifosovsky Journal of "Emergency Medical Care". 2015;3:30-35. (In Russian).
11. Sultan AA, Mallen C, Muller S, Hider S, Scott I, Helliwell T, et al. Antibiotic use and the risk of rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. BMC Med. 2019 Aug 7;17(1):154. DOI: 10.1186/s12916-019-1394-6

Информация о соавторах:

Годовалов Анатолий Петрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера» Минздрава России
ORCID: 0000-0002-5112-2003

Яковлев Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, врач стоматолог-ортопед ГБУЗ ПК «Городская стоматологическая поликлиника №1»
ORCID: 0000-0002-2895-387X

Information about co-authors:

Anatoliy P. Godovalov, PhD, MD, Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, E.A.Wagner Perm State Medical University
ORCID: 0000-0002-5112-2003

Mikhail V. Yakovlev, PhD, MD, dentist-orthopedist, City Dental Clinic No 1
ORCID: 0000-0002-2895-387X

НОВОСТИ НАУКИ

Домашние собаки способствуют распространению сальмонеллы, устойчивой к антибиотикам

Домашние животные, такие как домашние собаки, являются упускаемым из виду местом передачи зоонозных патогенов, таких как нетифозная сальмонелла (НТС). Учитывая близость собак к людям и использование критически важных антибиотиков в медицине домашних животных, домашние собаки представляют риск распространения сальмонеллы, устойчивой к противомикробным препаратам (AMR).

Исследователи идентифицировали все штаммы НТС, выделенные от домашних собак, с помощью в период с мая 2017 года по март 2023 года ($n = 87$), а также пространственно-временные сопоставленные штаммы, выделенные от людей NCBI ($n = 77$). Штаммы, выделенные от собак, включали различные серовары, большинство из которых были клинически значимы для здоровья человека. Все штаммы обладали детерминантами AMR для классов препаратов, которые ВОЗ считает критически или очень важными. Идентифицировали 16 изолятов НТС от людей, тесно связанных с ≥ 1 из шести штаммов, ассоциированных с собаками.

Эти данные подчеркивают важность антимикробного управления и постоянного биологического надзора за пределами ветеринарной медицины, связанной с человеком и сельским хозяйством.



Kenney SM, M'ikanatha NM, Ganda E.
Antimicrobial Resistance and Zoonotic Potential of Nontyphoidal Salmonella From Household Dogs.
Zoonoses Public Health. 2025 Feb;72(1):84-94. DOI: 10.1111/zph.13174

Распространенность бактерионосительства фагореzистентных штаммов *S. aureus* среди обучающихся медицинского вуза

Т.В.Рукосуева, О.В.Перьянова, И.Т.Решетнева, Д.В.Быкова, А.С.Смолик

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

Обучающиеся медицинского вуза имеют риск бактерионосительства госпитальных штаммов *Staphylococcus aureus*, связанный с работой в медицинских организациях или контактами с их сотрудниками. Санация бактерионосителей – одна из актуальных проблем современной медицины. Применение препаратов бактериофагов имеет ограничения, связанные с резистентностью, и требует определения чувствительности выделенных штаммов.

Цель. Оценка распространенности бактерионосительства золотистого стафилококка среди обучающихся медицинского вуза, определение чувствительности выделенных штаммов *S. aureus* к стафилококковому бактериофагу.

Пациенты и методы. На бактерионосительство *S. aureus* обследованы 370 обучающихся. Мазки со слизистой носа сеяли на элективные среды для выделения стафилококков. Культуры идентифицировали до вида и определяли массивность роста золотистого стафилококка по общепринятой методике. Чувствительность к бактериофагу определяли в реакции фаголизиса на плотной среде, для этого использовали Бактериофаг стафилококковый (АО НПО «Микроген», Пермь, Россия).

Результаты. Высеваемость *S. aureus* составила 23,24%, у мужчин в 1,6 раза выше, чем у женщин. Эпидемиологически значимыми бактерионосителями (массивность роста «+++» и «++++») являются 7,09%. Чувствительность к бактериофагу изучена у 83 культур золотистого стафилококка, большинство штаммов (68,67%) чувствительны, часть изолятов – 13,25% проявили слабую чувствительность, абсолютно резистентны – 18,07%. Штаммы, выделенные от студентов-бактерионосителей (с массивным ростом *S. aureus*), чувствительны к препарату в 80,77% случаев. Полученные результаты диктуют необходимость определения чувствительности изолятов *S. aureus* к стафилококковому бактериофагу в каждом случае его применения.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, бактерионосительство, стафилококковый бактериофаг, фагореzистентность, санация бактерионосителей

Для цитирования: Рукосуева Т.В., Перьянова О.В., Решетнева И.Т., Быкова Д.В., Смолик А.С. Распространенность бактерионосительства фагореzистентных штаммов *S. aureus* среди обучающихся медицинского вуза. Бактериология. 2025; 10(1): 75–81. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-75-81

Prevalence of carriage of phage-resistant *S. aureus* strains among medical school student

T.V.Rukosueva, O.V.Peryanova, I.T.Reshetneva, D.V.Bykova, A.S.Smolik

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

Medical students are at risk of carriage of hospital strains of *Staphylococcus aureus* due to their work in medical organizations or contacts with their employees. Sanitation of carriers is one of the pressing problems of modern medicine. The use of bacteriophage has limitations due to resistance and requires determining the sensitivity of the isolated strains.

Objective. Was to assess the prevalence of *S. aureus* carriage among medical students and to determine the sensitivity of the isolated *S. aureus* strains to the staphylococcal bacteriophage.

Patients and methods. 370 students were examined for carriage of *S. aureus*. Nasal mucosal smears were inoculated onto elective media to isolate staphylococci. The cultures were identified to the species level and the growth rate of *Staphylococcus aureus* was determined using the generally accepted method. Sensitivity to the bacteriophage was determined in the phagolysis reaction on a solid medium using staphylococcal bacteriophage (JSC NPO Mikroген, Perm, Russia).

Results. The *S. aureus* culture rate was 23.24%, 1.6 times higher in men than in women. Epidemiologically significant carriers of bacteria (growth rate of “+++” and “++++”) were 7.09%. Sensitivity to the bacteriophage was studied in 83 cultures of *S. aureus* isolated from students, the majority of strains (68.67%) were sensitive, some isolates – 13.25% showed weak

Для корреспонденции:

Рукосуева Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии им. доц. Б.М.Зельмановича ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
Телефон: (391) 220-1361

Статья поступила 30.09.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Tatiana V. Rukosueva, PhD in Biological Sciences, Associate Professor, department of microbiology, V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Address: 1 Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
Phone: (391) 220-1361

The article was received 30.09.2024, accepted for publication 31.03.2025

sensitivity, absolutely resistant – 18.07%. Strains isolated from students-carriers of bacteria (with massive growth of *S. aureus*) are 80.77% sensitive to the drug. The obtained results dictate the need to determine the sensitivity of *S. aureus* isolates to staphylococcal bacteriophage in each case of its use.

Key words: *Staphylococcus aureus*, carriage, staphylococcal bacteriophage, phage resistance, sanation of carriers

For citation: Rukosueva T.V., Peryanova O.V., Reshetneva I.T., Bykova D.V., Smolik A.S. Prevalence of carriage of phage-resistant *S. aureus* strains among medical school student. Bacteriology. 2025; 10(1): 75–81. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-75-81

Золотистый стафилококк является одним из ведущих возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, в том числе инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [1]. Профилактика инфекций, вызываемых *Staphylococcus aureus*, была и остается актуальной проблемой в практическом здравоохранении, поскольку потенциальными источниками инфекции могут быть не только больные, но и бактерионосители [2, 3]. Стафилококки являются представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек организма человека. Около 20% населения являются постоянными либо транзитными носителями *S. aureus* [4], показатели варьируют от 9 до 37% среди негоспитализированных лиц [5].

Для профилактики внутрибольничных инфекций необходима активный скрининг и деколонизация бактерионосителей *S. aureus* [6]. Показанием для проведения мероприятий по элиминации золотистого стафилококка являются критерии, определяющие риск данного состояния для самого носителя или эпидемиологическая опасность для его окружения [7]. Санация бактерионосителей – одна из актуальных и сложных проблем современной медицины. В связи с этим важное практическое значение приобретает разработка и выбор методов деколонизации слизистых верхних дыхательных путей, при этом важны не только их эффективность, но и пролонгированное действие.

Предложены различные методы санации бактерионосителей *S. aureus*: с применением фурацилина, риванола, раствора Люголя, настоя листьев эвкалипта, лизоцима, ингаляций в соляных шахтах и другие [8].

Доступным и безопасным для пациента методом является использование препаратов стафилококкового бактериофага. Эффективность литического действия фагов может быть ограничена отсутствием чувствительности к ним. Территориальные особенности распространения фагорезистентных штаммов стафилококков, циркулирующих в конкретном регионе, обуславливают необходимость микробиологического мониторинга [9]. В Красноярском крае отсутствуют опубликованные данные о чувствительности штаммов стафилококков к препаратам бактериофага, доступным в аптечной сети региона, что делает актуальным проведение таких исследований для практической медицины. Степень распространенности фагорезистентности служит обоснованием необходимости определения чувствительности к фагам при применении коммерческих препаратов с лечебной или профилактической целью.

Цель исследования: оценка распространенности бактерионосительства золотистого стафилококка среди обучающихся медицинского вуза и определение чувствительности выделенных штаммов *S. aureus* к стафилококковому бактериофагу.

Материалы и методы

На бактерионосительство золотистого стафилококка обследовано 370 обучающихся в возрасте 16–27 лет, среди них студенты медицинского вуза и подготовительного отделения – «Малой медицинской академии» (ММА). Доля женщин составила $68,38 \pm 2,42\%$ (253 человека), мужчин – $31,62 \pm 2,42\%$ (117 человек).

С целью выявления факторов риска формирования бактерионосительства золотистого стафилококка проанкетировано 58 обследуемых. В анкете респонденты указывали: пол, возраст, сведения о работе в медицинских организациях (МО), контактах с сотрудниками МО, госпитализации в течение предшествующих 12 месяцев, наличии хронических заболеваний, в т.ч. ЛОР-органов.

Материал для бактериологического исследования получали из передних отделов полости носа, используя стандартные стерильные сухие тампоны, – одним тампоном из обоих носовых ходов. Выделение и идентификация стафилококков проводились по общепринятой методике. Мазки, взятые со слизистой носа, сеяли на элективные питательные среды для выделения стафилококков (желточно-солевой агар (ЖСА) или маннитол-агар с добавлением яичного желтка). Посев производили тампоном, втирая материал со всей поверхности тампона, вращательными движениями сначала на ограниченном участке питательной среды (1–2 см²), а затем штрихами по всей поверхности. Культивировали посевы при температуре 37°C, 24–48 ч. Чистые культуры микроорганизмов идентифицировали с учетом культуральных, морфо-тинкториальных свойств, лецитовителлазной активности, ферментации маннита и глюкозы в анаэробных условиях, способности коагулировать кроличью плазму, гемолиза на 5% кровяном агаре (КА). При наличии в первичных посевах характерных для стафилококков колоний отсеивали (не менее двух) на скошенный агар для последующего определения видовой принадлежности. При наличии роста пигментированных колоний, но без проявлений лецитовителлазной активности, их также отсеивали для идентификации. Характерные колонии каждого типа, подозрительные на принадлежность к *S. aureus*, подсчитывали и ориентировочно определяли массивность роста «в крестах» по методике, описанной в Инструкции по бактериологическому обследованию на выявление носителей патогенного стафилококка (1978) [10]:

- ++++ – сливной рост;
- +++ – сплошной рост изолированных колоний;
- ++ – значительный рост (до 100 колоний);
- + – единичные колонии (10–25 колоний).

Выделение от обследуемого культуры *S. aureus* в количестве 10^3 и больше микробных клеток, снимаемых с тампона (что соответствует «++++» и более – сливной и сплошной

Таблица 1. Высеваемость *S. aureus*
Table 1. Isolation of *S. aureus*

Обследовано / Examined	Высеваемость <i>S. aureus</i> / Isolation of <i>S. aureus</i>		Высеваемость <i>S. aureus</i> в эпидемиологически значимом количестве / Isolation of <i>S. aureus</i> in epidemiological quantities	
	<i>n</i>	% ± sp	<i>n</i>	% ± sp
Всего / Total	370	100,00 ± 0,00	86	23,24 ± 2,20
Женщин / Women	253	68,38 ± 2,42	50	19,76* ± 2,50
Мужчин / Men	117	31,62 ± 2,42	36	30,77* ± 4,27

$\chi^2 = 13,92$; $p < 0,001$; * $Z = 2,2$, $p = 0,02$; ** $Z = 2,2$, $p = 0,02$; значимость различий высеваемости *S. aureus* в группах женщин и мужчин. /
 $\chi^2 = 13,92$; $p < 0,001$; * $Z = 2,2$, $p = 0,02$; ** $Z = 2,2$, $p = 0,02$; significance of differences in isolation of *S. aureus* within groups of women and men.

рост при посеве на ЖСА), является показателем высокой обсемененности слизистых носа. При этом происходит выделение стафилококков во внешнюю среду как при различных экспираторных актах, так и при спокойном дыхании. Следовательно, обследуемый является бактерионосителем *S. aureus* и представляет потенциальную эпидемиологическую опасность как источник инфекции.

Лабораторная идентификация фенотипа MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – метициллиноустойчивый золотистый стафилококк) проводилась методом скрининга с использованием маркерного антибиотика цефокситина (диски 30 мкг; OXOID, Великобритания). Диаметр зоны подавления роста бактерий вокруг диска менее 22 мм свидетельствовал о принадлежности изолятов к MRSA [11].

Определение чувствительности стафилококков к цефокситину и бактериофагу проводили на плотной среде – агаре Мюллера–Хинтона (HiMedia). Для тестирования готовили стандартную суспензию из суточной культуры в концентрации $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, соответствующей стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Посев производили «газоном» с последующим нанесением бактериофага в объеме 10 мкл и диска с цефокситином. Инкубировали 24 ч при температуре 35°C. Чувствительность к стафилококковому бактериофагу определяли в реакции фаголизиса с коммерческим препаратом Бактериофаг стафилококковый производства АО НПО «Микроген», Пермь, Россия; серия П51. Оценку литической активности бактериофага проводили в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике» (2014) [12] по пятибалльной шкале:

- «—» отсутствие литической активности;
- «+» низкая активность;
- «++» образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерий;
- «+++» зона лизиса с единичными колониями вторичного роста;
- «++++» прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста.

Культуру считали чувствительной при литической активности бактериофага «++++»; слабочувствительной – «+++», «++++»; резистентной – «—», «+».

Результаты

Для проведения микробиологических исследований применялись методики, представленные в разделе «Материалы

и методы», все они описаны в федеральных документах, разработанных для МО. Такой выбор обусловлен тем, что полученные результаты могут быть сопоставимы с другими опубликованными данными по проблеме стафилококкового бактерионосительства.

При бактериологическом исследовании 370 проб образцов назальной слизи, полученных от обучающихся медицинского университета, выделены и идентифицированы 86 культур *S. aureus*, которые имели типичные для этого вида свойства. На средах первичного посева отмечался рост круглых пигментированных колоний S-формы диаметром 2–4 мм желтоватого цвета с радужным венчиком, что указывало на способность микроорганизмов продуцировать лецитовителлазу (лецитиназу), а также был положительным каталазный тест с 1% перекисью водорода. При микроскопии мазков из типичных колоний обнаруживали грамположительных кокков, $d = 0,5 - 1,5$ мкм, с характерным расположением микробных клеток группами в виде «гроздей винограда». Изучение биохимических свойств выделенных культур показало: ферментацию глюкозы и маннита (в аэробных и анаэробных условиях) до кислоты без газа, образование желеобразного сгустка в цитратной плазме кролика – коагулазную активность. В случае роста типичных для стафилококков пигментированных колоний без радужного венчика либо при получении сомнительных результатов биохимических тестов (маннит и реакция плазмокоагулазы) дополнительно сеяли чистые культуры стафилококков на среду 5% КА, отмечали наличие вокруг колоний зон полного гемолиза.

При обследовании обучающихся медицинского вуза высеваемость *S. aureus* в целом составила $23,24 \pm 2,20\%$ (табл. 1), при этом у мужчин в 1,6 раза выше, чем у женщин ($30,77 \pm 4,27\%$ и $19,76 \pm 2,50\%$ соответственно, $p < 0,05$).

По данным ряда авторов, высеваемость золотистого стафилококка у разных групп населения подвержена большим колебаниям (9–70%) [5, 13, 14]; у студентов-медиков – от 21,9 до 36,4% [14, 15]. Полученные нами результаты, подтверждающие назальную колонизацию золотистым стафилококком обучающихся медицинского вуза, находятся в таких же пределах. Преобладание среди них лиц мужского пола согласуется с некоторыми исследованиями, проведенными в разных странах [16], хотя данные литературы по этому поводу противоречивы [17].

До настоящего времени стафилококк не теряет своей актуальности как один из основных возбудителей ИСМП. Студенты-медики уже с первых курсов и на всем протяжении обучения проходят практику и занимаются на клиниче-

Таблица 2. Чувствительность выделенных культур *S. aureus* к стафилококковому бактериофагу
Table 2. Sensitivity of isolated *S. aureus* cultures to staphylococcal bacteriophage

Всего исследовано изолятов <i>S. aureus</i> / Total <i>S. aureus</i> isolates studied	Чувствительность <i>S. aureus</i> к литическому действию бактериофага / Sensitivity of <i>S. aureus</i> to the lytic action of bacteriophage					
	Чувствительные штаммы / Sensitive strains «++++»		Слабочувствительные штаммы / Weakly sensitive strains «++», «+++»		Резистентные штаммы / Resistant strains «–», «+»	
	абс. / abs.	% ± sp	абс. / abs.	% ± sp	абс. / abs.	% ± sp
83	57	68,67 ± 5,09	11	13,25 ± 3,72	15	18,07 ± 4,22

Таблица 3. Чувствительность культур *S. aureus* к стафилококковому бактериофагу, выделенных в эпидемиологически значимом количестве
Table 3. Sensitivity of *S. aureus* cultures to staphylococcal bacteriophage isolated in epidemiologically significant quantities

Исследовано изолятов <i>S. aureus</i> , выделенных от бактерионосителей / <i>S. aureus</i> isolates recovered from carriers of the bacteria were studied	Чувствительность <i>S. aureus</i> , выделенных от бактерионосителей к литическому действию бактериофага / Sensitivity of <i>S. aureus</i> isolated from carriers to the lytic action of bacteriophage					
	Чувствительные штаммы / Sensitive strains «++++»		Слабочувствительные штаммы / Weakly sensitive strains «++», «+++»		Резистентные штаммы / Resistant strains «–», «+»	
	абс. / abs.	% ± sp	абс. / abs.	% ± sp	абс. / abs.	% ± sp
26	21	80,77 ± 7,73	1	3,85 ± 3,77	4	15,38 ± 7,08

ских базах МО. Учитывая эти обстоятельства, актуальным является выявление бактерионосительства *S. aureus* у данного контингента лиц.

Количество колоний с тампона при посеве варьировало от единичных (ЕК) до сливного роста. В нашем исследовании выявлено $7,03 \pm 1,33\%$ бактерионосителей с интенсивностью роста колоний «+++» и «++++», что составило около трети от числа всех обследуемых, у кого был выделен золотистый стафилококк.

Интерес представляет анализ влияния внешних факторов среды обитания на формирование носительства *S. aureus* у студентов медицинского вуза. Вероятно, одними из возможных причин контаминации больничной микрофлорой являются работа в медицинских организациях и внутрисемейный или другой пролонгированный контакт с медицинскими сотрудниками. Однако мы не получили статистически значимых различий высеваемости золотистого стафилококка у студентов, работающих в МО, и тех, кто не сообщил об этом при анкетировании, $Z = 0,50$, $p > 0,05$. Также достоверно не установлено влияние профессионального риска на количественный показатель обсемененности слизистых оболочек передних отделов носовых ходов. Высеваемость стафилококков с массивностью роста +++ и выше у работающих/близко контактирующих лиц составила $27,50 \pm 7,06\%$, у не имеющих контактов – $11,11 \pm 7,41\%$; $Z = 1,60$, $p > 0,05$.

На взаимоотношение микроб–макроорганизм оказывает влияние множество факторов. Тесное общение в коллективе обучающихся с ежедневным совместным пребыванием в учебных аудиториях способствует формированию бактерионосительства у этой категории населения. При анализе анкетных данных студентов была отмечена тенденция к «гнездовому» распределению и выявлению нескольких бактерионосителей одновременно в отдельных учебных группах.

Результаты проведенного скрининга культур на метициллинрезистентность также согласуются с данными других авторов о частоте выделения MRSA от амбулаторных пациентов [14, 15, 17, 18]. В нашем исследовании штамм MRSA выделен от одного студента ($0,27 \pm 0,27\%$ числа обследованных лиц), что составило $1,16 \pm 1,20\%$ всех исследованных

культур *S. aureus*. У обследуемого степень обсемененности с тампона составила менее 10 колоний, что не позволяет отнести его к бактерионосителям. По данным анкетирования, он не работает в МО и не имеет постоянных контактов с сотрудниками МО, что, однако, не исключает вероятность распространения MRSA-штамма внутри коллектива обучающихся.

Санация бактерионосителей необходима как мера профилактики ИСМП, обусловленных золотистым стафилококком. Однако до сих пор существуют проблемы, связанные с различной эффективностью методов деколониации слизистых носа и длительностью сохраняемого эффекта. В сложившихся условиях одним из подходов может быть использование бактериофагов. Практика использования лечебно-профилактических бактериофагов показала необходимость осуществления бактериологического мониторинга из-за возможного изменения фаголизависимости [19–21]. Современные лечебно-профилактические бактериофаги представляют собой комплекс поликлональных, высоковирулентных бактериальных вирусов, специально подобранных против часто встречающихся штаммов. Доля чувствительных штаммов стафилококков, по данным многих исследований, доминирует и составляет от 82,3 до 87,1% изолятов, однако имеются региональные особенности распространения устойчивости [22–25]. В то же время фагочувствительность *S. aureus*, циркулирующих на территории Красноярского края, еще недостаточно изучена.

Чувствительность к коммерческому бактериофагу производства АО НПО «Микроген» (Пермь) определена у 83 изолятов *S. aureus*. Большинство штаммов ($68,67 \pm 5,09\%$) чувствительны к данному препарату (табл. 2). При этом некоторые проявили слабую чувствительность, их удельный вес составил $13,25 \pm 3,72\%$, или были абсолютно резистентными – $18,07 \pm 4,22\%$.

Штаммы, выделенные от бактерионосителей с высокой степенью обсеменения слизистых носа (эпидемиологически значимое количество), также в основном чувствительны к литическому действию фага, их доля составила $80,77 \pm 7,73\%$, $Z = 5,63$, $p < 0,001$ (табл. 3).

Так как для санации бактерионосителей допускается использование препарата, обладающего литической активностью не менее «++++» [26], то в отношении трети штаммов, выделенных от обследованных нами обучающихся ($31,32 \pm 5,09\%$), использование изученного коммерческого бактериофага клинически нецелесообразно [27]. Выделенный от одного обследуемого изолят MRSA также был резистентным к действию фага, что не противоречит данным литературы о низкой чувствительности MRSA к таким препаратам [28, 29].

Заключение

По результатам проведенного исследования, у четверти студентов медицинского вуза ($23,24 \pm 2,20\%$) на слизистой носа обнаружен *S. aureus*. При этом эпидемиологически значимыми носителями являются $7,09 \pm 1,33\%$.

Риск бактерионосительства *S. aureus* выше у лиц мужского пола. Высеваемость *S. aureus* в 1,6 раза выше, чем у женщин, в эпидемиологически значимом количестве выше в 2,5 раза.

Широкое распространение золотистого стафилококка среди обследованного контингента требует выбора надежных методов санации бактерионосителей из арсенала разработанных на сегодняшний день, одним из которых является использование бактериофагов.

Практическое применение коммерческих препаратов может быть ограничено низкой чувствительностью, что обуславливает необходимость проведения мониторинга популяционной распространенности устойчивых штаммов в конкретном регионе.

Чувствительность выделенных изолятов к препарату Бактериофаг стафилококковый (АО НПО «Микроген», Пермь), который поставляется в аптечную сеть в Красноярском крае, в целом составила $68,67 \pm 5,09\%$. Известно, что целевой спектр активности коммерческих препаратов бактериофагов должен быть не менее 70%. Полученные нами данные подтверждают целесообразность назначения этого препарата для санации стафилококковых бактерионосителей.

Около трети изученных штаммов ($31,32 \pm 5,09\%$) проявили резистентность. При этом эффективность санации бактерионосителей золотистого стафилококка среди обучающихся медицинского вуза имеет особое значение как мера профилактики ИСМП. Полученные результаты диктуют необходимость включать в алгоритм бактериологического исследования определение чувствительности к фагу в каждом случае выделения *S. aureus*.

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

- ВОЗ. План действий для повышения уровня готовности и реагирования систем общественного здравоохранения в Европейском регионе ВОЗ, 2018–2023 гг. 19 марта 2019 г. Публикации (дата обращения 16.08.24).
- Бухарин ОВ, Усвятцов БА, Карташова ОЛ. Биология патогенных кокков. М.: Медицина; Екатеринбург: УрО РАН, 2002.
- Rotman SG, Sumrall E, Ziadlou R, Grijpma DW, Richards RG, Eglin D, et al. Local Bacteriophage Delivery for Treatment and Prevention of Bacterial Infections. *Front Microbiol.* 2020 Sep 18;11:538060. DOI: 10.3389/fmicb.2020.538060
- Федеральные клинические рекомендации. Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НАСКИ). «Эпидемиология и эпидемиологический мониторинг инфекций, вызванных метициллинрезистентными штаммами золотистого стафилококка», 2014. Режим доступа: <http://nasci.ru/>
- Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;398:55-87. DOI: 10.1007/82_2016_497
- Перец ОВ, Медведева НВ, Матвеева НР, Чухров ЮС. Фрагменты метаанализа по оценке эффективности деколонизации назального носительства *Staphylococcus aureus* у пациентов хирургических стационаров. *Инфекция и иммунитет.* 2017;(S):806.
- Бухарин ОВ, Усвятцов БА. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). Екатеринбург: УрО РАН, 1996.
- Методические рекомендации. Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. «Диагностика и санация стафилококковых бактерионосителей», 2001.
- Борисенко АЮ, Джиоев ЮП, Перетолчина НР, Степаненко ЛА, Кузьминова ВА, Кокорина ЛА, и др. Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR/Cas-систем в геноме штамма *Staphylococcus aureus* и оценка профилей фаговых рас, детектируемых через CRISPR-кассету бактерий. *Acta Biomedica Scientifica.* 2018;3(5):49-53.
- Инструкция по бактериологическому обследованию на выявление носителей патогенного стафилококка и проведению санации. Приложение к Приказу Минздрава СССР от 31.07. 1978 № 720.
- Рекомендации. «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», Версия 2021-01. МАКМАХ. Режим доступа: <https://www.antibiotic.ru/> (дата обращения 16.08.24).
- Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике. Федеральные клинические рекомендации. М., 2014.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005 Dec;5(12):751-62. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4
- Бажукова ТА, Симонян ЕЭ. Распространенность и характеристика носительства *Staphylococcus aureus* у студентов медицинского вуза. Сборник научных работ V-го Международного молодежного конкурса. Том Часть II. Молодежь в науке: новые аргументы. 2016;78-81.
- Широкова ИЮ, Шишкин ГА, Чанышева РФ, Глазовская ЛС, Ефимова ТВ. Распространенность и характеристика носительства *Staphylococcus aureus* у студентов медицинских вузов (двухцентровое исследование). *Медицина в Кузбассе.* 2013;12(2):79-83.
- Mehraj J, Akmatov MK, Strömpl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, et al. Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. *PLoS One.* 2014 Sep 24;9(9):e107937. DOI: 10.1371/journal.pone.0107937
- Хохлова ОЕ, Акушева ДН, Перьянова ОВ, Корецкая НМ, Абарникова ОВ, Королькова ЕК, и др. Молекулярно-генетические особенности метициллин-

- резистентных *S. aureus*, выделенных от лиц пенитенциарной системы, инфицированных ВИЧ. Сибирское медицинское обозрение. 2018;2(110):13-18. DOI: 10.20333/2500136-2018-2-13-18
18. Тамразова ОБ. Возможности преодоления антибиотикорезистентности в терапии пиодермий. Клиническая дерматология и венерология. 2014;12(6):64-73. DOI: 10.17116/klinderma2014664-73
19. Акимкин ВГ, Дарбеева ОС, Колков ВФ. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. Клиническая практика. 2010;4(4):48-54.
20. Саидов А, Сабурова Ю. Бактерионосительство стафилококковой инфекции. Interpretation and Researches. 2024;2(7(29)). Режим доступа: <https://interpretationandresearches.uz/index.php/iar/article/view/2392/> DOI: 10.5281/zenodo.11075840
21. Орлова ОА, Юмцунова НА, Семененко ТА, Карпов ОЗ, Русакова ЕВ, Зотова АА, и др. Новые технологии в комплексе мероприятий по неспецифической профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Гигиена и санитария. 2020;99(10):1055-60. DOI: 10.47470/0016-9900-2020-99-10-1055-1060
22. Чанышева РФ, Ковалишена ОВ, Присада ТВ. Оптимизация применения бактериофагов для борьбы с инфекциями по результатам регионального микробиологического мониторинга. Медицинский альманах. 2017;4(49):33-37.
23. Перепанова ТС, Казаченко АВ, Малова ЮА, Хазан ПЛ, Назиров МР, Псеунова ДР, и др. Возможности улучшения терапевтической активности препаратов бактериофагов. Экспериментальная и клиническая урология. 2023;16(4):156-63. DOI: 10.29188/2222-8543-2023-16-4-156-163
24. Алешкин АВ, Селькова ЕП, Ершова ОН, Савин ИА, Шкода АС, Бочкарева СС, и др. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Фундаментальная и клиническая медицина. 2018;3(2):66-73. DOI: 10.23946/2500-0764-2018-32-66-74
25. Вакарин АА, Катаева ЛВ, Степанова ТФ. Влияние бактериофагов на чувствительность условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019;96(2):3-7. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-3-7
26. Федеральные клинические рекомендации. «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике», 2014.
27. Летаров АВ. Современные концепции биологии бактериофагов. М.: ТД ДеЛи, 2019.
28. Лагун ЛВ, Кульвинский ЕА, Кульвинская НА. Исследование чувствительности метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* к антибиотикам и препаратам бактериофагов. Проблемы здоровья и экологии. 2024;21(1):93-101. DOI: 10.51523/2708-6011.2024-21-1-12
29. Хараева ЗФ, Виссарионов ВА, Мустафаев МШ, Блиева ЛЗ, Барокова ЕБ, Мустафаева СМ, и др. Оценка чувствительности к бактериофагам штаммов, выделенных у детей с врожденными пороками челюстно-лицевой области. Доклады Адыгской (Черкесской) Международной академии наук. 2020;20(1):40-45. DOI: 10.47928/1726-9946-2020-20-1-40-45
4. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. Natsional'naya assotsiatsiya spetsialistov po kontrolyu infektsii, svyazannykh s okazaniem meditsinskoi pomoshchi (NASKI). «Epidemiologiya i epidemiologicheskii monitoring infektsii, vyzvannykh metitsillinrezistentnymi shtammami zolotistogo stafilokokka», 2014. Available at: <http://nasci.ru/> (In Russian).
5. Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:55-87. DOI: 10.1007/82_2016_497
6. Perets OV, Medvedeva NV, Matveeva NP, Chukhrov YuS. Fragments of a meta-analysis assessing the effectiveness of decolonization of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in surgical patients. Infection and Immunity. 2017;(S):806. (In Russian).
7. Bukharin OV, Usvyatsov BYa. Bacterial carriage (medical and environmental aspect). Ekaterinburg: UrO RAN, 1996. (In Russian).
8. Metodicheskie rekomendatsii. Federal'nyi tsentr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii. «Diagnostika i sanatsiya stafilokokkovykh bakterionositelei», 2001. (In Russian).
9. Borisenko AYU, Dzhiyev YuP, Peretolchina NP, Stepanenko LA, Kuzminova VA, Kokorina LA, et al. Bioinformation search and analysis of structures of CRISPR/Cas systems in phage *Staphylococcus aureus* genome and estimation of profiles of phage detected through CRISPR-cassette bacteria. Acta Biomedica Scientifica. 2018;3(5):49-53. DOI: 10.29413/abs.2018-3.5.7 (In Russian).
10. Instruksiya po bakteriologicheskomu obsledovaniyu na vyyavlenie nositelei patogennogo stafilokokka i provedeniyu sanatsii. Prilozhenie k Prikazu Minzdrava SSSR ot 31.07. 1978 № 720. (In Russian).
11. Rekomendatsii. «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam», Versiya 2021-01. IACMAC. Available at: <https://www.antibiotic.ru/> (дата обращения 16.08.24). (In Russian).
12. Racional'noe primenenie bakteriofagov v lechebnoj i protivoepidemicheskoy praktike. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. Moscow, 2014. (In Russian).
13. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005 Dec;5(12):751-62. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4
14. Bazhuokova TA, Simonyan EE. Prevalence and characteristics of carriage of *Staphylococcus aureus* in medical students. A Collection of Scientific Works of the V International Youth Competition. Volume Part II. Youth in Science: New Arguments. 2016:78-81. (In Russian).
15. Shirokova IU, Shishkin GA, Chanycheva RF, Glazovskaya LS, Efimova TV. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* carriage in students of higher educational medical institutions (two-centre study). Medicine in Kuzbass. 2013;12(2):79-83. (In Russian).
16. Mehraj J, Akmatov MK, Strömpl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, et al. Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. PLoS One. 2014 Sep 24;9(9):e107937. DOI: 10.1371/journal.pone.0107937
17. Khokhlova OE, Akusheva DN, Peryanova OV, Koretskaya NM, Abarnikova OV, Korolkova EK, et al. Molecular-genetic features of methicillin-resistant *S. aureus* isolated from individuals in the penitentiary system infected with HIV. Siberian Medical Review. 2018;2(110):13-18. DOI: 10.20333/2500136-2018-2-13-18 (In Russian).
18. Tamrazova OB. Overcoming antibiotic resistance in treatment of pyoderma. Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology. 2014;12(6):64-73. DOI: 10.17116/klinderma2014664-73 (In Russian).
19. Akimkin VG, Darbeeva OS, Kolkov VF. Bacteriophages: Historical and modern aspects of their application: Experience and prospects. Clinical Practice. 2010;4(4):48-54. (In Russian).
20. Saidov A, Saburova Y. Bacterial carriage of staphylococcal infection. Interpretation and Researches. 2024;2(7(29)). Available at: <https://interpretationandresearches.uz/index.php/iar/article/view/2392/> DOI: 10.5281/zenodo.11075840

References

1. Action plan to improve public health preparedness and response in the WHO European Region 2018–2023. 19 March 2019 Publication. Available at: <http://www.euro.who.int/ru/publications/abstracts/action-plan-to-improve-public-health-preparedness-and-response-in-the-who-european-region-20182023> (accessed 16.08.24). (In Russian).
2. Bukharin OV, Usvyatsov BYa, Kartashova OL. Biology of pathogenic cocci. Moscow: Meditsina; Ekaterinburg: UrO RAN, 2002. (In Russian).
3. Rotman SG, Sumrall E, Ziadlou R, Grijpma DW, Richards RG, Eglin D, et al. Local Bacteriophage Delivery for Treatment and Prevention of Bacterial Infections. Front Microbiol. 2020 Sep 18;11:538060. DOI: 10.3389/fmicb.2020.538060

21. Orlova OA, Yumtsunova NA, Semenenko TA, Karpov OE, Rusakova EV, Zotova AA, et al. New technologies in complex measures for nonspecific prophylaxis of healthcare-associated infections. *Hygiene and Sanitation*. 2020;99(10):1055-60. DOI: 10.47470/0016-9900-2020-99-10-1055-1060 (In Russian).
22. Chanycheva RF, Kovalishena OV, Prisada TV. Optimization of the use of bacteriophages to control infections based on the results of regional microbiological monitoring. *Medical Almanac*. 2017;4(49):33-37. (In Russian).
23. Perepanova TS, Kazachenko AV, Malova YuA, Khazan PL, Nazirov MR, Pseunova DR, et al. Possibilities for improving the therapeutic activity of bacteriophage preparations. *Experimental and Clinical Urology*. 2023;16(4):156-63. DOI: 10.29188/2222-8543-2023-16-4-156-163 (In Russian).
24. Aleshkin AV, Sel'kova EP, Ershova ON, Savin IA, Shkoda AS, Bochkareva SS, et al. Concept of personalized phage therapy for intensive care unit patients with healthcare-associated infections. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2018;3(2):66-73. DOI: 10.23946/2500-0764-2018-32-66-74 (In Russian).
25. Vakarina AA, Kataeva LV, Stepanova TF. Influence of bacteriophages on sensitivity of conditionally pathogenic bacteria to antibacterial preparations. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(2):3-7. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-3-7 (In Russian).
26. Federal'nye klinicheskie rekomendacii. «Racional'noe primeneniye bakteriofagov v lechennoj i protivoepidemicheskoy praktike», 2014. (In Russian).
27. Letarov AV. Modern concepts of the biology of bacteriophages. Moscow: TD DeLi, 2019. (In Russian).
28. Lagun LV, Kulvinsky EA, Kulvinskaya NA. Study of the sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to antibiotics and bacteriophage preparations. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2024;21(1):93-101. DOI: 10.51523/2708-6011.2024-21-1-12 (In Russian).
29. Kharaeva ZF, Vissarionov VA, Mustafaev MSh, Blieva LZ, Barokova EB, Mustafaeva SM, et al. Evaluation of sensitivity to bacteriophages of strains

isolated from children with congenital malformations of the maxillofacial region. Reports of the Adyghe (Circassian) International Academy of Sciences. 2020;20(1):40-45. DOI: 10.47928/1726-9946-2020-20-1-40-45 (In Russian).

Информация о соавторах:

Перьянова Ольга Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии им. доц. Б.М.Зельмановича ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Решетнева Ирина Тимофеевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии имени доц. Б.М.Зельмановича ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Быкова Дарья Викторовна, студентка педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Смолик Александр Сергеевич, лаборант лаборатории медицинской кибернетики и управления в здравоохранении, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Information about co-authors:

Olga V. Peryanova, PhD in Biological Sciences, Associate Professor, department of microbiology, V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Irina T. Reshetneva, MD, PhD, Associate Professor, department of microbiology, V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Darya V. Bykova, Student, pediatric department, V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Alexander S. Smolik, Laboratory Assistant, Laboratory of Medical Cybernetics and Healthcare Management, V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

НОВОСТИ НАУКИ

Антибиотик, преодолевающий резистентность, для лечения сибирской язвы

Кризис устойчивости к противомикробным препаратам (АМП) был связан с миллионами смертей. Особую обеспокоенность вызывает угроза биологического оружия, примером которого является сибирская язва. Введение новых антибиотиков помогает смягчить АМП, но не устраняет угрозу биологического оружия с искусственной устойчивостью. Установлено, что тейксобактин, антибиотик без обнаруживаемой устойчивости, уникально подходит для решения проблемы сибирской язвы, используемой в качестве оружия. Тейксобактин связывается с неизменными мишенями, предшественниками полимеров клеточной стенки. Показано, что тейксобактин очень эффективен в модели ингаляционной сибирской язвы у кроликов. Вдыхание спор *Bacillus anthracis* вызывает подавляющую заболеваемость и смертность. Лечение кроликов тейксобактином после начала заболевания быстро устраняет патоген из крови и тканей, нормализует температуру тела и предотвращает повреждение тканей. Тейксобактин собирается в необратимую надмолекулярную структуру на поверхности мембраны *B. anthracis*, что, вероятно, способствует его необычайно высокой эффективности против сибирской язвы. Антибиотики, избегающие резистентности, представляют собой рациональное решение как для AMR, так и для искусственного биологического оружия.



Lawrence WS, Peel JE, de Winter R, Ling LL, Nitti AG, Peoples AJ, et al. Teixobactin: A Resistance-Evading Antibiotic for Treating Anthrax. *ACS Infect Dis*. 2025 Mar 14;11(3):727-737. DOI: 10.1021/acsinfectdis.4c00835

Сравнительная оценка гуморального иммунитета против *Francisella tularensis* методами реакции агглютинации и иммуноферментного анализа

Т.В.Гапельченкова, В.М.Павлов, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова, Т.И.Комбарова

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

В настоящее время существует проблема создания новых вакцинных туляремиальных штаммов, стабильных и менее реактогенных. Одними из важнейших серологических методов оценки иммунной реакции у лабораторных животных на введение вакцинных штаммов являются реакция агглютинации и иммуноферментный анализ.

Целью нашего исследования являлась интегральная оценка гуморального иммунитета против двух подвигов subsp. *holarctica* и subsp. *tularensis* *F. tularensis* с использованием инактивированных мертиолятом натрия бактериальных суспензий в методах реакции агглютинации и иммуноферментного анализа.

В работе показано, что на титры агглютинации сывороток мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ не оказывает влияние инактивация мертиолятом натрия бактерий *F. tularensis* и подвида *holarctica* или *tularensis*. А уровни специфических антител IgG к суммарному антигену несколько выше при использовании в иммуноферментном анализе лизата бактерий подвида *tularensis*, чем подвида *holarctica*.

Получены данные о динамике изменения специфических титров класса IgG и титров агглютинации в сыворотках иммунных мышей в течение 6 месяцев наблюдения.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, агглютинация, антитела, иммунодиагностика

Для цитирования: Гапельченкова Т.В., Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И. Сравнительная оценка гуморального иммунитета против *Francisella tularensis* методами реакции агглютинации и иммуноферментного анализа. Бактериология. 2025; 10(1): 82–86. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-82-86

Comparative evaluation of humoral immunity against *Francisella tularensis* by agglutination and elisa

T.V.Gapelchenkova, V.M.Pavlov, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova, T.I.Kombarova

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

Currently, there is the problem of creating new vaccine tularemia strains that are stable and less reactogenic. One of the most important serological methods for assessing the immune response in laboratory animals to the administration of vaccine strains is agglutination and enzyme immunoassay.

The objective of our study was the integral assessment of humoral immunity against two subspecies subsp. *holarctica* и subsp. *tularensis* *F. tularensis* using sodium mercurate-inactivated bacterial suspensions in agglutination reaction and enzyme-linked immunosorbent assay methods.

The study shows that the titers of agglutination of the sera of mice immunized with the strain *F. tularensis* 15 NIEG are not affected by inactivation of the bacteria *F. tularensis* with sodium mercurate and subspecies: *holarctica* or *tularensis*. And the levels of specific IgG antibodies to the total antigen are slightly higher when used in the enzyme-linked immunosorbent assay of bacteria of the *tularensis* subspecies than of the *holarctica* subspecies.

Data were obtained on the dynamics of changes in specific IgG class titers and agglutination titers in the sera of immune mice during 6 months of observation.

Key words: *Francisella tularensis*, agglutination, antibodies, immunodiagnostics

For citation: Gapelchenkova T.V., Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I. Comparative evaluation of humoral immunity against *Francisella tularensis* by agglutination and elisa. Bacteriology. 2025; 10(1): 82–86. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-82-86

Для корреспонденции:

Гапельченкова Татьяна Владимировна, 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. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-017
E-mail: tgapelchenkova@obolensk.org

Статья поступила 04.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Tatiana V. Gapelchenkova, Junior Researcher, Plague microbiology laboratory of the department of especially dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: tgapelchenkova@obolensk.org

The article was received 04.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Туляремия – зоонозная природноочаговая инфекция, представляющая серьезную опасность для населения Российской Федерации. Природные очаги этого возбудителя встречаются практически на всей территории страны [1]. Ежегодно в России регистрируются от 100 до 400 случаев туляремии [1]. У людей после перенесенной инфекции формируется специфический гуморальный и клеточный иммунитет, который сохраняется более пяти лет [2].

Лабораторная диагностика гуморального иммунитета к туляремии основывается главным образом на иммунологических методах [3]. Самым простым и доступным методом является антигенный эритроцитарный диагностикум на основе секретируемых антигенов *F. tularensis* subsp. *holarctica* [4]. Данный метод позволяет выявлять специфические иммуноглобулины подклассов IgG и IgM [5].

Для выявления специфических иммуноглобулинов подклассов IgG и IgM к поверхностным антигенам *F. tularensis* используют реакцию агглютинации (РА) с инактивированными прогревом бактериальными суспензиями туляремии микроба [6].

Наиболее чувствительным методом определения специфических антител всех подклассов является иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием суммарного комплекса антигенов [5].

В настоящем исследовании проведено сравнение РА на инактивированных мертиолятом натрия (МН) суспензиях бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica* и subsp. *tularensis* и метода твердофазного ИФА с использованием адсорбированного ультразвукового дезинтеграта бактерий этих подвидов. Данное сравнение проведено на сыворотках мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, взятых в разные сроки после иммунизации. А также оценили влияние обработки МН бактериальных суспензий и сроки хранения клеток на агглютинирующие свойства.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Перечень штаммов, использованных в работе, представлен в таблице.

Таблица. Характеристика штаммов, использованных в работе
Table. The Strains of microorganisms used of in the work characterization

Название / Name	Характеристика / Characteristic	Источник / ссылка Source / Reference
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм / vaccine strain	ГКПМ-Оболensk / SCPMCC-Obolensk
<i>F. tularensis</i> B399	subsp. <i>tularensis</i> , природный штамм / natural strain	ГКПМ-Оболensk / SCPMCC-Obolensk
<i>F. tularensis</i> 3m/23-2	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> , 503 с двумя делетированными копиями гена <i>iglC</i> / <i>F. tularensis</i> 503 with two deleted copies of the <i>iglC</i> gene	ГКПМ-Оболensk / SCPMCC-Obolensk [1]
<i>F. tularensis</i> T-2	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> B399 с двумя делетированными копиями гена <i>iglC</i> / <i>F. tularensis</i> B399 with two deleted copies of the <i>iglC</i> gene	НИ This study

ГКПМ-Оболensk – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур / SCPMCC-Obolensk – State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures.

Бактериальные культуры выращивали на L-агаре или FT-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk) при температурах 25–37°C. При необходимости в среду добавляли 100 мкг × мл⁻¹ полимиксина В, 5% сахарозы и 6 мкг × мл⁻¹ хлорамфеникола. Бактериальные суспензии инактивировали добавлением МН, в соотношении 1 : 10 000 (0,01%) [7] с последующим прогревом при температуре 37°C в течение 2 ч. Инактивированные суспензии хранили при +4°C для дальнейшего использования.

Аттенуация туляремии микроба. Удаление в геноме штамма *F. tularensis* B399 двух копий гена *iglC* проводили по методике, описанной ранее [1].

Животные. В исследованиях использовались мыши линии BALB/c самцы/самки (19 ± 3 г). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Все эксперименты с животными были одобрены комитетом по биоэтике.

Сыворотки. Сыворотки были получены от групп мышей линии BALB/c ($n = 3$), иммунизированных внутривенно штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 3×10^3 КОЕ через 30, 60, 90 и 180 сут после иммунизации. Цельную кровь выдерживали при температуре + 4°C в течение 18 ч. Образовавшуюся сыворотку отбирали, обеззараживали добавлением раствора МН, как описано ранее [7], и инкубировали при температуре + 4°C в течение 18 ч. Аликвоты хранили при температуре – 18°C.

Реакция агглютинации. Сенсибилизацию 96-луночных круглодонных планшет (Biofil, China) проводили двухсуточной агаровой культурой штаммов *F. tularensis*. Для этого в каждую лунку вносили 10⁸ КОЭ бактериальной суспензии в объеме 50 мкл в забуференном физиологическом растворе (PBS). Затем в лунки вносили двукратные разведения сывороток мышей в объеме 50 мкл, в контрольные лунки добавляли PBS. Далее планшеты инкубировали в термостате (TC-1180 СпУ, Россия) при температуре + 37°C в течение 1 ч, а затем инкубировали в холодильнике при +4°C в течение 48 ч. Предварительный визуальный учет результатов проводили через 24 ч.

ИФА. Для сенсибилизации 96-луночных планшет (ООО «КОМПАНИЯ СОВТЕХ», Россия) использовали ультразвуковой дезинтегратор бактериальных суспензий штаммов *F. tularensis* 10⁸ КОЕ/мл, инактивированных прогревом при температуре +95°C, в течение 10 мин., в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6). Ультразвуковой дезинтегратор бактериальных суспензий получали в результате трехкратной обработки ультразвуком (Col Parmer, USA) мощностью 20% (100 W) в течение 15 секунд, с перерывом между каждым циклом в 15 секунд. ИФА проводили по методике как описано ранее [8]. Титром антител считали величину наибольшего разведения иммунной сыворотки, которой соответствовала оптическая плотность (ОП) 450 нм, превосходящая контрольное значение на 0,1 единицу, при условии достижения значения ОП не меньше 0,2. Все данные выражены как среднее ± стандартная ошибка. Для статистического анализа использовали Graph Pad Prism 8.4.3 (Graph Pad Software, La Jolla, CA). Выполняли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

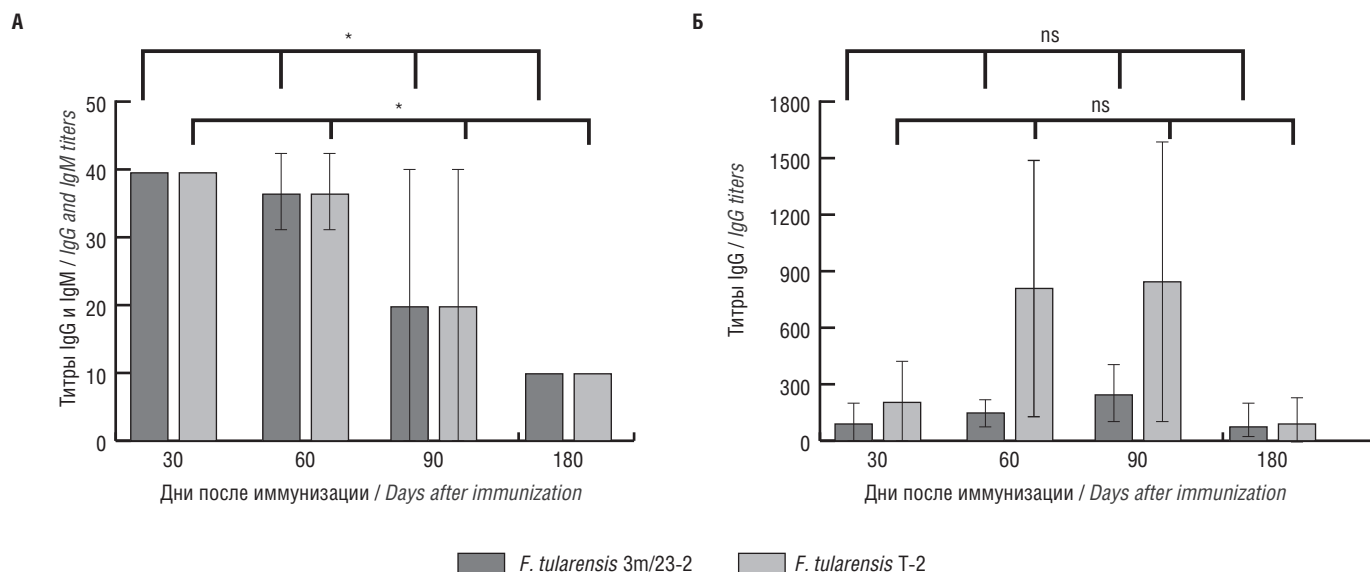


Рисунок. ТА и титры специфических антител сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ на *F. tularensis* 3m/23-2 и *F. tularensis* T-2 в разные сроки, после иммунизации: А – ТА; Б – титры специфических антител класса IgG. Статистическую значимость определяли с помощью логарифмического критерия Каплана–Мейера (Graph Pad Prism 8.4.3), ns – $p > 0,05$, * $p < 0,05$.

Fig. TA and titers of specific antibodies of BALB/c mice sera immunized with *F. tularensis* 15 strain of NIEG on *F. tularensis* 3m/23-2 and *F. tularensis* T-2 at different times after immunization: А – TA, Б – titers of specific IgG antibodies.

Statistical significance was determined using the Kaplan–Meier log-rank test (Graph Pad Prism 8.4.3), ns – $p > 0.05$, * $p < 0.05$.

Результаты исследования

На начальном этапе проведено сравнение титров агглютинации (ТА) иммунных сывороток мышей на бактериальную суспензию *F. tularensis* 3m/23-2 через 30 дней после иммунизации с добавлением в сыворотки МН и без МН. В обоих случаях титр был одинаковый и составил 1/40, что указывает на отсутствие негативного влияния 0,01% МН на РА. Обработанные МН суспензии *F. tularensis* потеряли способность к росту на ФТ-агаре, вследствие чего они считались безопасными для дальнейшего использования.

Хранение бактериальной суспензии *F. tularensis* 3m/23-2 с 0,01% МН при температуре +4°C в течение 3 мес. не влияло на ее агглютинирующие свойства: ТА сывороток оставался на уровне 1/40.

В дальнейших экспериментах по агглютинации были использованы инактивированные МН бактериальные суспензии *F. tularensis*.

Оценку влияния подвида *F. tularensis* на их агглютинирующую и антиген-связывающую способности в РА и ИФА проводили с использованием бактерий: *F. tularensis* 3m/23-2 подвид subsp. *holarctica* и *F. tularensis* T-2 подвид subsp. *tularensis* и сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отобранных через 30, 60, 90 и 180 дней после иммунизации.

ТА и титры специфических антител на суспензии сравниваемых штаммов или их ультразвуковые дезинтеграты представлены на рисунке.

Полученные результаты показали, что ТА сывороток на антигены бактериальных суспензий *F. tularensis* 3m/23-2 и *F. tularensis* T-2 достоверно не отличались между собой независимо от сроков после иммунизации. Максимальные ТА наблюдали через 30 дней после иммунизации, с последующим их снижением к 60, 90 и 180-му дню.

Из рисунка 1Б следует, что титры специфических антител к антигенам *F. tularensis* T-2 достоверно выше титров к антигенам *F. tularensis* 3m/23-2. Титр специфических антител IgG в сыворотках мышей повышается с 30 по 90-е сутки после иммунизации, а к 180-му дню – существенно снижается.

Обсуждение

Для проверки возможности использования инактивированных бактериальных суспензий *F. tularensis* в РА было проведено сравнение значений ТА на живые бактериальные суспензии и обработанные раствором МН. Инактивация бактериальных суспензий *F. tularensis* раствором МН не влияет на способность иммуноглобулинов классов IgM и IgG связываться с поверхностными антигенами туляремиального микроба. Таким образом, для бактерий *F. tularensis* в РА помимо прогрева можно использовать обработку бактериальной суспензии МН [7]. Причем у этой суспензии агглютинирующие свойства сохранялись в течение 3 мес. при температуре +4°C. Кроме того, инактивация сывороток МН также не снижает эффективность взаимодействия антител с антигенами в РА.

Идентичность ТА бактериальных суспензий двух подвигов *F. tularensis*: *holarctica* и *tularensis* в РА с сыворотками мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (относящийся к подвиду *holarctica*), указывает на подобие поверхностных антигенных структур этих подвигов туляремиального микроба.

В отличие от РА в ИФА с адсорбированными на планшет ультразвуковыми дезинтегратами бактерий подвигов *holarctica* и *tularensis*, уровень специфических антител IgG в иммунных сыворотках несколько выше к антигенам бактерии подвида *tularensis*, выяснение причины данного эффекта является предметом дальнейших исследований.

Уровни антител у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, определяемые методами РА и ИФА, отличаются временной динамикой: в РА наблюдается постепенное снижение титров, а в ИФА – плавное повышение до 90-го дня, а затем снижение. Такое отличие, вероятно, связано с тем, что в РА больший вклад вносят антитела класса IgM, чем IgG.

Заключение

В проведенной работе предложен безопасный метод постановки РА с использованием обеззараженных культур *F. tularensis* двух подвидов subsp. *holarctica* и *tularensis* и показано, что ТА и уровни специфических антител к суммарному антигену туляремиального микроба у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отличаются временной динамикой: в РА происходит постепенное снижение титров с 30 по 180-й день, а в ИФА наблюдается плавное повышение до 90-го дня, а затем снижение.

Предложенную схему подготовки бактериальных суспензий *F. tularensis* предполагается использовать для изучения взаимодействия сывороток экспериментальных животных, иммунизированных кандидатами в вакцинные штаммы *F. tularensis* с бактериальными клетками природных изолятов туляремиального микроба.

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 that there is no conflict of interest.

Литература

1. Мокриевич АН, Павлов ВМ, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Бахтеева ИВ, и др. Свойства бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica*, лишенных способности синтезировать белок IgIC. Бактериология. 2017;2(4):17-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24
2. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II. Колл. авторов. Под ред. Лабинской АС, Костюковой НН, Ивановой СМ. М.: Издательство БИНОМ, 2012;729-754.
3. Сырова НА, Терешкина НЕ, Девдариани ЗЛ. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;3(97):12-15.
4. Кошкидько АГ. Совершенствование технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации ее возбудителя: специальность 1.5.6. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт». Ставрополь, 2023.
5. Максимова НЕ, Мочульская НН, Емельянов ВВ. Основы иммуноанализа: учебное пособие. Под общ. ред. Мочульской НН. Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2021;77-88, 117-136.

6. Anderson RV, Crane DD, Bosio CM. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs. Vaccine. 2010 Sep 14;28(40):6562-72. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.072
7. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР. Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001;7.
8. Williamson ED, Vesey PM, Gillhespy KJ, Eley SM, Green M, Titball RW. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. Clin Exp Immunol. 1999 Apr;116(1):107-14. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00859.x
9. Whelan AO, Flick-Smith HC, Homan J, Shen ZT, Carpenter Z, Khoshkenar P, et al. Protection induced by a *Francisella tularensis* subunit vaccine delivered by glucan particles. PLoS One. 2018 Oct 8;13(10):e0200213. DOI: 10.1371/journal.pone.0200213
10. Peruski AH, Peruski LF Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul;10(4):506-13. DOI: 10.1128/cdli.10.4.506-513.2003
11. Wayne Conlan J, Oyston PC. Vaccines against *Francisella tularensis*. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1105:325-50. DOI: 10.1196/annals.1409.012
12. Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00313-6
13. Ерёмкин АВ, Елагин ГД, Печенкин ДВ, Фоменков ОО, Богачёва НВ, Кытманов АА, и др. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональной тест-систем для выявления возбудителя туляремии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(3):184-187. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187
14. Терешкина НЕ, Терехова ИВ, Сырова НА, Девдариани ЗЛ, Ляшова ОЮ, Григорьева ГВ, и др. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремиального микроба «Диатул-М». Проблемы особо опасных инфекций. 2013;2:42-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-42-45
15. Карцева АС, Калмантаева ОВ, Силкина МВ, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Фирстова ВВ. Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020;3:62-69. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69
16. Демидова ТН, Алешо НА, Михайлова ТВ, Семихин АС. Туляремия: Учебное пособие. М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 2020;34-35.
17. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I. Коллектив авторов. Под ред. Лабинской АС, Волиной ЕГ. М.: Издательство БИНОМ, 2008;521-537.

References

1. Mokrievich AN, Pavlov VM, Vakhrameeva GM, Mironova RI, Kombarova TI, Bakhteeva IV, et al. Properties of *F. tularensis* subsp. *holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize IgIC protein. Bacteriology. 2017;2(4):17-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24 (In Russian).
2. Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Chastnaya meditsinskaya mikrobiologiya i etiologicaleskaya diagnostika infektsii. Kniga II. Koll. avtorov. Pod red. Labinskoi AS, Kostjukovoi NN, Ivanovoi SM. Moscow: "BINOM" Publ., 2012;729-754. (In Russian).
3. Syrova NA, Tereshkina NE, Devdariani ZL. Current state of tularemia immunodiagnostics. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;3(97):12-15. (In Russian).
4. Koshkid'ko AG. Sovershenstvovanie tekhnologii proizvodstva eritrotsitarnykh preparatov dlya diagnostiki tulyaremii i indikatsii ee vozбудitelya: spetsial'nost' 1.5.6. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. FKUZ «Stavropol'skii nauchno-issledovatel'skii protivochumnyi institut». Stavropol', 2023. (In Russian).

5. Maksimova NE, Mochul'skaya NN, Emel'yanov VV. Osnovy immunoanaliza: uchebnoe posobie. Pod obshch. red. Mochul'skoi NN. Ministerstvo nauki i vysshego obrazovaniya Rossiiskoi Federatsii, Ural'skii federal'nyi universitet. Ekaterinburg: Izd-vo Ural. un-ta, 2021;77-88, 117-136. (In Russian).
6. Anderson RV, Crane DD, Bosio CM. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs. *Vaccine*. 2010 Sep 14;28(40):6562-72. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.072
7. Obeyzarzhivanie issleduemogo materiala, infitsirovannogo bakteriyami I-IV grupp patogennosti, pri rabote metodom PTsR. Metodicheskie ukazaniya. Moscow: Federal'nyi tsentr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2001;7. (In Russian).
8. Williamson ED, Vesey PM, Gillhespy KJ, Eley SM, Green M, Titball RW. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr;116(1):107-14. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00859.x
9. Whelan AO, Flick-Smith HC, Homan J, Shen ZT, Carpenter Z, Khoshkenar P, et al. Protection induced by a Francisella tularensis subunit vaccine delivered by glucan particles. *PLoS One*. 2018 Oct 8;13(10):e0200213. DOI: 10.1371/journal.pone.0200213
10. Peruski AH, Peruski LF Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jul;10(4):506-13. DOI: 10.1128/cdli.10.4.506-513.2003
11. Wayne Conlan J, Oyston PC. Vaccines against Francisella tularensis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1105:325-50. DOI: 10.1196/annals.1409.012
12. Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in Francisella tularensis. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 May 28;222(2):273-80. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00313-6
13. Eremkin AV, Elagin GD, Petchenkin DV, Fomenkov OO, Bogatcheva NV, Kitmanov AA, et al. The development of immune enzyme and immune chromatographic monoclonal test-system for detecting tularemia agent. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(3):184-187. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187 (In Russian).
14. Tereshkina NE, Terekhova IV, Syrova NA, Devdariani ZL, Lyashova OYu, Grigor'eva GV, et al. Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system "Diatul-M" for tularemia microbe detection. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2013;2:42-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-42-45 (In Russian).
15. Kartseva AS, Kalmantaeva OV, Silkina MV, Kombarova TI, Pavlov VM, Mokrievich AN, et al. Characterization of Immunogenic and Protective Properties of the Modified Variants of the Strain Francisella tularensis 15 NIEG. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;3:62-69. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69 (In Russian).
16. Demidova TN, Alesho NA, Mikhailova TV, Semikhin AS. Tulyaremiya: Uchebnoe posobie. Moscow: FGBOU DPO RMANPO Minzdrava Rossii, 2020;34-35. (In Russian).
17. Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya. Kniga I. Kollektiv avtorov. Pod red. Labinskoi AS, Volinoy EG. Moscow: "BINOM" Publ., 2008;521-537. (In Russian).

Информация о соавторах:

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

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

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

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

Information about co-authors:

Vitaliy M. Pavlov, PhD, DSc in Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Tularemia Microbiology, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Galina M. Vakhrameeva, Researcher, Department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Raisa I. Mironova, Researcher, Laboratory of Tularemia Microbiology, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

НОВОСТИ НАУКИ

Исследователи используют спаривание комаров для распространения грибов, борющихся с малярией

Энтомопатогенные грибы, разработанные для экспрессии нейротоксинов, специфичных для насекомых, продемонстрировали потенциал в качестве агентов микробного контроля против малярийных комаров. В настоящее время основным методом применения является прямой контакт спор с комарами, отдыхающими в помещении. Однако многие комары, переносящие малярию, питаются и отдыхают на открытом воздухе. Для борьбы с ними разработан альтернативный метод, который использует летальность трансгенных грибов как заболевания, передающегося половым путем от комаров. Этот подход имеет как более широкое междисциплинарное значение, так и важные последствия для профилактики заболеваний, переносимых комарами.



Bilgo E, Lovett B, Millogo AS, Sare I, Gnambani EJ, Leger RS, et al. Transmission of transgenic mosquito-killing fungi during copulation. *Sci Rep*. 2025 Jan 16;15(1):2181. DOI: 10.1038/s41598-024-83242-5

Пути снижения уровня контаминации биологического материала при посеве на плотные питательные среды, используемые для выделения микобактерий туберкулезного комплекса

И.В.Сидоров¹, Р.А.Шарипов², Ш.Э.Булатов¹, Л.Р.Галеева¹, Д.Р.Гадельмурзина¹, Р.Н.Исламов¹

¹ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер», Уфа, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Российская Федерация;

Одной из наиболее значимых проблем в бактериологической диагностике туберкулеза и микобактериозов, вызываемых медленно растущими микобактериями, остается контаминация посевов клинического материала на питательных средах посторонней быстрорастущей сапрофитной бактериальной микрофлорой и микроскопическими грибами, населяющими верхние дыхательные пути, ротовую полость и другие нестерильные биотопы организма человека. Это влечет за собой выбраковку контаминированных посевов и невозможность дальнейшей работы с ними, приводит к задержкам, а в некоторых случаях и к невозможности получения врачом-клиницистом своевременной и полной информации о результатах микробиологического исследования клинического материала, затрудняет постановку и верификацию диагноза, что, в свою очередь, неизменно отражается на качестве лечения.

Цель. Изучить возможность применения поливалентного бактериофага и противогрибкового препарата в качестве эффективных деконтаминирующих агентов при посеве образцов клинического материала на плотные среды.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы клинического материала (мокрота). В качестве дополнительного деконтаминирующего агента использовали смесь поливалентного бактериофага и антимикотика. Накопление и изучение свойств культур микроорганизмов осуществлялось классическим культуральным методом на специальных и дифференциально-диагностических питательных средах и методом световой микроскопии окрашенных микропрепаратов.

Результаты. Исследование продемонстрировало возможность использования препаратов, обладающих антибактериальным и антимикотическим эффектом, для снижения уровня контаминации засеваемых образцов биологического материала при выделении культур *Mycobacterium tuberculosis* complex. Были получены убедительные данные, свидетельствующие о высокой эффективности в отношении наиболее значимых контаминационных агентов антимикотического препарата Амфотерицин В и поливалентного бактериофага.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии туберкулезного комплекса, деконтаминация, диагностика туберкулеза, контаминирующая микрофлора, скорость роста микобактерий

Для цитирования: Сидоров И.В., Шарипов Р.А., Булатов Ш.Э., Галеева Л.Р., Гадельмурзина Д.Р., Исламов Р.Н. Пути снижения уровня контаминации биологического материала при посеве на плотные питательные среды, используемые для выделения микобактерий туберкулезного комплекса. Бактериология. 2025; 10(1): 87–90. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-87-90

Ways to reduce the level of contamination of biological material samples when seeding on solid nutrient media used to isolate mycobacteria of the tuberculosis complex

I.V.Sidorov¹, R.A.Sharipov², Sh.E.Bulatov¹, L.R.Galeeva¹, D.R.Gadel'murzina¹, R.N.Islamov¹

¹Republican Clinical Tuberculosis Dispensary, Ufa, Russian Federation;

²Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

Contamination of clinical seed material on culture media by extraneous fast-growing saprophytic bacterial microflora and microscopic fungi inhabiting the upper respiratory tract, oral cavity and other non-sterile biotopes of the human body remains one of the most significant problems in the bacteriological diagnosis of tuberculosis and mycobacteriosis caused by slow-growing mycobacteria. This entails the culling of contaminated specimens and the impossibility of further work with them, leads to delays, and in some cases, the inability of a clinician to receive timely and complete information about the results of microbiological examination of clinical material, complicates the formulation and verification of the diagnosis, which in turn invariably affects the quality of treatment.

Для корреспонденции:

Сидоров Игорь Вячеславович, врач-бактериолог ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Адрес: 450080, Уфа, ул. Сагита Агиша, 4
Телефон: (347) 284-29-50

Статья поступила 25.09.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Igor V. Sidorov, bacteriologist, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Address: 4 Sagit Agish str., Ufa, 450080, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-00

The article was received 25.09.2024, accepted for publication 31.03.2025

The purpose of the work is to study the possibility of using a polyvalent bacteriophage and an antifungal drug as effective decontaminating agents when inoculating samples of clinical material on solid media.

Materials and methods. The study used specimens of clinical material (sputum). A mixture of a polyvalent bacteriophage and an antimycotic was used as an additional decontaminating agent. The accumulation and study of the properties of microorganism cultures was carried out by the classical cultural method on special and differential diagnostic nutrient media and by the method of light microscopy of stained micropreparations.

The results of this research demonstrated the possibility of using substances with antibacterial and antimycotic effects in order to reduce the level of contamination of inoculated specimens of biological material in order to isolate *Mycobacterium tuberculosis* complex culture. Convincing data were obtained indicating high efficacy against the most significant contaminating agents of the antimycotic drug Amphotericin B and the polyvalent bacteriophage.

Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, decontamination, diagnosis of tuberculosis, contaminating microflora, growth rate of mycobacteria

For citation: Sidorov I.V., Sharipov R.A., Bulatov Sh.E., Galeeva L.R., Gadel'murzina D.R., Islamov R.N. Ways to reduce the level of contamination of biological material samples when seeding on solid nutrient media used to isolate mycobacteria of the tuberculosis complex. Bacteriology. 2025; 10(1): 87–90. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-87-90

В структуре микроорганизмов, являющихся наиболее значимыми с точки зрения опасности контаминирования посевов факторами, преобладающими являются бактерии родов *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella* и некоторые другие; среди грибковой микрофлоры – *Candida* spp., *Aspergillus* spp. и некоторые другие [1]. Помимо этого, заметную негативную роль играет необеспечение (или невозможность обеспечения) асептических условий при получении проб стерильных видов биоматериалов. Основной исследуемый во фтизиатрической практике биоматериал, мокрота, исходно содержит большое количество слизи, имеет высокую вязкость и интенсивное обсеменение сопутствующей грибово-бактериальной микрофлорой ротовой полости и верхних отделов дыхательных путей. Схожими недостатками обладают образцы биоматериала и из других нестерильных биотопов организма человека. Посторонняя микрофлора, размножаясь гораздо интенсивнее, чем микобактерии, быстро покрывает поверхность питательных сред и истощает их, что резко снижает вероятность роста и обнаружения колоний микобактерий [2]. Это приводит к снижению интенсивности роста микобактериальной культуры на питательных средах для их культивирования, что затрудняет постановку теста лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам. Особое значение данный фактор имеет при попытках выделить микобактерии из клинического материала, получаемого инвазивными методами, например при бронхоскопии, плевральных пункциях, оперативных вмешательствах и др. Поэтому для повышения эффективности культурального метода обнаружения микобактерий в клиническом материале образцы обязательно подвергаются процедуре гомогенизации и деконтаминации. С этой целью перед посевом применяются 3%-й раствор серной кислоты, 4%-й раствор едкого натра (модифицированный метод Петрова) или 10%-й раствор Na_3PO_4 . Однако обработка кислотой или щелочью, наряду с задержкой роста сапрофитной контаминантной микрофлоры, одновременно в довольно высокой степени ингибирует рост микобактерий [6]. Сегодня во многих бактериологических лабораториях туберкулезного профиля применяется метод гомогенизации и деконтаминации с использованием N-ацетил-L-цистеина (NALC-NaOH), который обеспечивает эффективное разжижение вязких образцов клинического материала. Гидроксид натрия является эффективным деконтаминантом. Цитрат натрия связывает ионы тяжелых металлов. Сниженная концентрация гидроксида натрия способствует лучшей выживаемости микобактериальной

популяции, однако при этом интенсивность подавления роста контаминирующей микрофлоры также снижается [7]. Помимо общепринятых методов деконтаминации, предлагаются альтернативные, в частности, на основе щавелевой кислоты, хлоргексидина и других субстратов [8, 9].

Следует отметить, что на диагностическую ценность любого лабораторного исследования, в т.ч. посева на жидкие и плотные питательные среды с целью обнаружения микобактерий, в значительной степени влияет ряд факторов. На преаналитическом этапе, на который приходится до 75% ошибок [3], это правильность сбора материала пациентом, соблюдение асептики при заборе стерильных материалов, режим и сроки его хранения и транспортировки до доставки в лабораторию и др. [4]. На этапе аналитическом – выбраковка некачественных образцов клинического материала, используемые деконтаминанты и режим деконтаминации, достаточность гомогенизации материала, состав используемых питательных сред, объем инокулируемого материала и др.

На сегодняшний день культуральный метод, основывающийся на выделении чистой культуры микобактерий из клинического материала, все еще остается золотым стандартом и является основным в лабораторной диагностике туберкулеза, в основном вследствие его относительной дешевизны и доступности для любой бактериологической лаборатории фтизиатрического профиля, что дает возможность определения культуральных свойств микобактерий, облегчает идентификацию видовой принадлежности.

Для культивирования микобактерий в клинической практике применяются как плотные (на яичной или агаровой основе), так и жидкие питательные среды. Оба метода посева имеют свои достоинства и недостатки. Применение жидких сред с использованием системы BactecMGIT 960 в сравнении с посевом на плотные питательные среды позволяет получить результат в более ранние сроки, при этом показатель положительных результатов примерно вдвое выше [5]. Однако использование жидких сред для посева клинического материала имеет свои ограничения. В частности, невозможно оценить культуральные признаки микобактерий; на жидких питательных средах более выражен рост сопутствующей бактериальной и грибковой микрофлоры, что влечет за собой более высокий удельный вес посевов, подлежащих выбраковке. В связи с этим сохраняется актуальность использования в рутинной практике специальных плотных питательных сред для получения изолированных колоний и культурально-го обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Цель исследования – изучить возможность применения поливалентного бактериофага и противогрибкового препарата в качестве эффективных деконтаминирующих агентов при посеве образцов клинического материала на плотные среды.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан.

В исследование были включены посевы на плотную питательную среду Левенштейна–Йенсена для культивирования микобактерий. Исследуемый клинический материал ($n = 314$) был представлен мокротой. Перед посевом образцы клинического материала гомогенизировали раствором NALC-NaOH. К исследуемому материалу добавлялся раствор NALC-NaOH в соотношении 1:1, производилось перемешивание на шейкере в течение 15 мин, затем центрифугирование при 3000 g в течение 15 мин. Надосадочная жидкость сливалась, а полученный осадок приблизительно в равных объемах вносился в две пробирки на поверхность скошенной питательной среды Левенштейна–Йенсена.

В одну из пробирок (опытная группа) непосредственно перед посевом вносили деконтаминирующий агент в количестве 0,5 мл, представляющий собой смесь препарата «Пиобактериофаг комплексный» и противогрибкового препарата Амфотерицин В (приготовленного в соотношении 50 мг антимикотика на 100 мл поливалентного бактериофага). «Пиобактериофаг комплексный» (НПО «Микроген», Россия) включает смесь стерильных очищенных фильтратов фаголизатов бактерий *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и энтеропатогенных *Escherichia coli*. Общее число посевов составило 628.

Просмотр пробирок на наличие роста колониеобразующих единиц производился еженедельно через 30 дней после посева. В образцах, где был обнаружен рост микроорганизмов на поверхности питательной среды, оценивали культуральные свойства выросших культур, а также методом световой микроскопии просматривали препараты, окрашенные по методу Циля–Нильсена, с целью определения чистоты культуры.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные в результате анализов данные свидетельствуют об относительной эффективности применения деконтаминирующей смеси («Пиобактериофаг комплекс-

ный» + Амфотерицин В) в отношении снижения частоты случаев роста посторонней микрофлоры при посевах клинического материала на плотные питательные среды. Помимо этого, наблюдается некоторое (в данном случае статистически незначимое) увеличение частоты случаев положительных (вследствие ингибирования используемыми деконтаминантами жизнедеятельности контаминирующих микроорганизмов) «МБТК+» результатов инкубации по истечении 90 дней после посева, что отображено в таблице.

Культуры микроорганизмов из пробирок из опытной и контрольной групп были ориентировочно идентифицированы с помощью световой микроскопии микропрепаратов, окрашенных по методу Грама и по методу Циля–Нильсена. В результате установлено, что в контрольной группе в 12 пробирках из 14 выросли колонии дрожжеподобных грибов рода *Candida* (в т.ч. одна смешанная культура грибов рода *Candida* и кислотоустойчивых микобактерий), в двух остальных – грамтрицательные палочки. Обе культуры грамтрицательных палочек идентифицировали по биохимическим свойствам с помощью тест-систем ENTEROtest 16 (Erba Lachema, Чехия) как *E. coli* и *K. pneumoniae*.

Микропрепараты культур из опытной группы с ростом контаминантной микрофлоры, окрашенные по методу Циля–Нильсена, были изучены под световым микроскопом. Микроскопическая картина позволила предположить, что в обоих случаях контаминирующими микроорганизмами были дрожжеподобные грибы рода *Candida* в монокультуре (без признаков роста кислотоустойчивых бактерий). Данные культуры были пересеяны на хромогенный агар для грибов рода *Candida* HiCrome *Candida* Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Также была определена чувствительность этих культур к Амфотерицину В диско-диффузионным методом. Таким образом, установили, что оба контаминирующих агента относятся к устойчивым к Амфотерицину В дрожжеподобным грибам вида *Candida krusei*.

Исходя из полученных данных, можно резюмировать, что использование в качестве деконтаминирующего агента NALC-NaOH и смеси «Пиобактериофага комплексного» и Амфотерицина В имеет некоторое преимущество ввиду уменьшения удельного веса посевов с ростом контаминирующей микрофлоры. Можно также полагать, что побочным эффектом этого в ряде случаев может стать некоторое увеличение удельного веса посевов с ростом чистой культуры *M. tuberculosis*, которые в дальнейшем могут быть использованы для постановки теста лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам. Еще одним

Таблица. Влияние деконтаминации на рост микрофлоры в образцах через 90 дней после посева

Table. Effect of decontamination on the growth of microflora in samples 90 days after sowing

Способ деконтаминации / Method of decontamination	Наличие роста (количество образцов) / Presence of growth (number of samples)			
	Чистая культура / Pure culture of <i>M. tuberculosis</i>	Контаминированная микрофлорой / Contaminated with microflora	Отсутствие роста / No growth	Всего / Total
NALC-NaOH (контрольная группа) / (control group)	49	14	251	314
NALC-NaOH + смесь («Пиобактериофаг комплексный» + Амфотерицин В) (опытная группа) / NALC-NaOH + mixture (“Pyobacteriophage complex” + Amphotericin B) (experimental group)	50	2	262	314

достоинством подавления роста контаминирующей микрофлоры данными высокоспецифичными деконтаминантами без выраженного губительного эффекта на популяцию микобактерий является возможность точно установить факт действительного отсутствия микобактерий в образце клинического материала. В данном случае контаминанты не подавляют рост микобактерий на самых ранних стадиях инкубации посевов, «маскируя» наличие кислотоустойчивых микобактерий.

Таким образом, наблюдается повышение эффективности и информативности культурального метода за счет уменьшения выбраковки посевов вследствие контаминации, а в ряде случаев становится возможной выдача положительного (рост микобактерий туберкулеза) или отрицательного результата (отсутствие роста микобактерий туберкулеза), что в противном случае было бы вообще невозможно (если имела место контаминация стерильного клинического материала, получение которого сопряжено с инвазивными вмешательствами, например, спинно-мозговой или плевральной жидкости, резецированных тканей и др.).

Коллектив авторов выражает искреннюю благодарность безвременно ушедшему наставнику, соратнику, доктору медицинских наук, профессору Айрату Радиковичу Мавзютову, идейному вдохновителю данного научного исследования.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Лямин АВ. Контаминирующая микрофлора при обследовании на туберкулез: зависимость от питательных сред для первичного посева. Астраханский медицинский журнал. 2019;14(4):29-36. / Lyamin AV. Contaminating microflora in tuberculosis examination: dependence on culture media for basic seeding. Astrakhan Medical Journal. 2019;14(4):29-36. DOI: 10.17021/2019.14.4.29.36 (In Russian).
2. Narvaiz de Kantor I, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P, et al. Laboratory Services in Tuberculosis Control Part III: Culture. Geneva: WHO. 1998.
3. Спиридонова ЛГ, Тен МБ, Лабутин ИВ. Совершенствование бактериологической диагностики туберкулеза органов дыхания. Современные проблемы науки и образования. 2019;1 (сетевое издание) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28501> (дата обращения: 12.05.2024). / Spiridonova LG, Ten MB, Labutin IV. Improving the bacteriological diagnosis of respiratory tuberculosis. Modern problems of science and education. 2019;1 [Electronic resource]. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28501> (accessed 12.05.2024).
4. Родионова ЮД, Гусякова ОА, Лямин АВ, Бородулина ЕА, Козлов АВ. Оценка влияния условий хранения мокроты на витальные свойства микобактерий туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2017;95(1):42-46. / Rodionova YuD, Gusiakova OA, Lyamin AV, Borodulina EA, Kozlov AV. Evaluation of the influence of sputum storage conditions on the vital properties of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis and Lung Diseases. 2017;95(1):42-46.
5. Севастьянова ЭВ, Пузанов ВА, Смирнова ТГ, Ларионова ЕЕ, Черноусова ЛН. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2015;1:35-41. / Sevast'yanova EV, Puzanov VA, Smirnova TG, Larionova EE, Chernousova LN. Evaluation of the complex of microbiological and molecular genetic research methods for the diagnosis of tuberculosis. Tuberculosis and Lung Diseases. 2015;1:35-41.
6. Ерохин ВВ, Голышевская ВИ, Севастьянова ЭВ, Шульгина МВ. Микробиологические методы диагностики туберкулеза: Эпидемиология туберкулеза. Характеристика возбудителя туберкулеза. Лабораторные методы диагностики туберкулеза: Теоретическое учебное пособие для проведения курсов обучения: «Выявление туберкулеза методом микроскопии», «Культуральные методы диагностики туберкулеза». М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008;40. / Erokhin VV, Golyshvskaya VI, Sevast'yanova EV, Shul'gina MV. Microbiological methods of diagnosis of tuberculosis: Epidemiology of tuberculosis. Characteristics of the causative agent of tuberculosis. Laboratory methods of diagnosis of tuberculosis: A theoretical textbook for conducting training courses: "Detection of tuberculosis by microscopy", "Cultural methods of diagnosis of tuberculosis". Tver: Triada Publishing House; 2008. 40 p.
7. Залуцкая ОМ, Сагал'чик ЕР, Суркова ЛК. Руководство по лабораторной диагностике туберкулеза. Минск, 2013;135. / Zalutskaya OM, Sagal'chik ER, Surkova LK. Guidelines for laboratory diagnosis of tuberculosis. Minsk: Ministry of Health of the Republic of Belarus, 2013;135.
8. McClean M, Stanley T, Stanley S, Maeda Y, Goldsmith CE, Shepherd R, et al. Identification and characterization of breakthrough contaminants associated with the conventional isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2011 Sep;60(Pt 9):1292-8. DOI: 10.1099/jmm.0.030619-0
9. Патент 2786394 Российская Федерация, МПК C12N 1/04. Способ снижения уровня контаминации клинического материала при посеве на плотные питательные среды для выделения *Mycobacterium tuberculosis* complex: №2022106813: заявл. 15.03.2022: опубл. 20.12.2022. Шарипов РА, Мавзютов АР, Галеева ЛР, Байгузина ЗР, Сидоров ИВ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО БГМУ. 7 с. / Sharipov RA, Mavzyutov AR, Galeeva LR, Bayguzina ZR, Sidorov IV. Method for reducing the level of contamination of clinical material when inoculated on solid culture media for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Patent RF, No 2786394. 2022.

Информация о соавторах:

Шарипов Рауль Ахнафович, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фтизиатрии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Булатов Шамиль Энгельсович, главный врач ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Галеева Люция Ревовна, врач-бактериолог ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Гадельмурзина Динара Радиковна, врач-бактериолог ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Исламов Ринат Нафкатович, врач торакальный хирург ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Information about co-authors:

Raul A. Sharipov, MD, PhD, Head of Department, Bashkir State Medical University

Shamil E. Bulatov, Chief Physician, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Lucia R. Galeeva, Bacteriologist, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Dinara R. Gadel'murzina, Bacteriologist, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Rinat N. Islamov, Thoracic surgeon, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Набор штаммов бактерий для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы

Е.В.Растунцева, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов, О.Ю.Ляшова

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

В настоящее время регистрируются спорадические случаи заболевания людей и животных сибирской язвой в отдельных регионах Российской Федерации. Причины риска осложнения эпидемиологической обстановки – наличие стационарных неблагополучных по сибирской язве пунктов, завоз сырья и продукции животноводства из стран с неблагоприятной эпизоотической ситуацией. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой опирается в том числе на результаты комплексной лабораторной диагностики, что требует целенаправленной подготовки специалистов. Актуальная задача организации практических занятий – обучение в полном объеме регламентированным методам исследования в случае подозрения на сибирскую язву при повышении безопасности приобретения навыков манипуляций с *Bacillus anthracis* путем замены вирулентных штаммов на авирулентные.

Цель. Создание набора учебных штаммов бактерий для совершенствования методического обеспечения и снижения биологических рисков при подготовке специалистов по лабораторной диагностике сибирской язвы.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы бактерий: *B. anthracis*, *Bacillus cereus*, родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Применяли аналитический, бактериологический, иммунологические, молекулярно-генетический, биологический методы исследования.

Результаты. Разработаны критерии подбора штаммов возбудителя сибирской язвы. Сформирован набор в составе: авирулентный и вирулентный штаммы *B. anthracis* (2), штамм *B. cereus* (1), фоновые микроорганизмы (3).

Заключение. Применение набора позволяет обучающимся освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики сибирской язвы, приобрести на практических занятиях навыки безопасной работы с патогенными биологическими агентами II группы, снизив вероятность лабораторного инфицирования.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, учебные штаммы, подготовка специалистов, биологическая безопасность, лабораторная диагностика сибирской язвы

Для цитирования: Растунцева Е.В., Малюкова Т.А., Попов Ю.А., Ляшова О.Ю. Набор штаммов бактерий для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы. Бактериология. 2025; 10(1): 91–99. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-91-99

A set of bacterial strains for training in microbiology and laboratory diagnostics of anthrax

E.V.Rastuntseva, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov, O.Yu.Lyashova

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

Currently, sporadic cases of anthrax in humans and animals are registered in certain regions of the Russian Federation. The reasons for the risk of complications of the epidemiological situation are the presence of stationary points unfavorable for anthrax, import of raw materials and livestock products from countries with an unfavorable epizootic situation. Epidemiological surveillance of anthrax is based, among other things, on the results of comprehensive laboratory diagnostics, which requires targeted training of specialists.

Objective. The urgent task of organizing practical classes is to fully train in regulated research methods in case of suspected anthrax while increasing the safety of acquiring skills in manipulating *Bacillus anthracis* by replacing virulent strains with avirulent ones. Creation of a set of training strains of bacteria to improve methodological support and reduce biological risks in the training of specialists in laboratory diagnostics of anthrax.

Materials and methods. The following bacterial strains were used in the work: *B. anthracis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* genera. Analytical, bacteriological, immunological, molecular genetic, and biological research methods were used.

Results. Criteria for selecting strains of the anthrax pathogen were developed. A set was formed consisting of: avirulent and virulent strains of *B. anthracis* (2), strain *B. cereus* (1), background microorganisms (3).

Для корреспонденции:

Растунцева Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 51-52-30

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 09.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Elena V. Rastuntseva, MD, PhD, senior researcher of the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor

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

Phone: (8452) 51-52-30

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 09.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Conclusion. The use of the set allows students to fully master the regulated methods of laboratory diagnostics of anthrax, acquire skills in safe work with PBA of group II during practical classes, reducing the likelihood of laboratory infection.

Key words: *Bacillus anthracis*, educational set of strains, training of specialists, biological safety, laboratory diagnostics of anthrax

For citation: Rastuntseva E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A., Lyashova O.Yu. A set of bacterial strains for training in microbiology and laboratory diagnostics of anthrax. Bacteriology. 2025; 10(1): 91–99. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-91-99

Сибирская язва продолжает оставаться одной из актуальных опасных инфекционных болезней в мире. Заболеваемость людей и животных в России на данный момент характеризуется выявлением спорадических случаев заражения в отдельных регионах, что обусловлено соблюдением мер профилактики, проведением комплексного эпидемиологического надзора [1–3]. С 2009 по 2018 г. заболели 90 человек (23 вспышки) в 14 субъектах шести федеральных округов Российской Федерации (РФ); в 2019–2020 гг. – 10 человек; в 2022–2023 гг. – 21 человек и 14 сельскохозяйственных животных (9 вспышек) в 5 субъектах трех федеральных округов РФ [1–4]. Напряженная ситуация по заболеваемости животных и людей сибиреязвенной инфекцией сохраняется на территориях стран ближнего и дальнего зарубежья, что не исключает завоз сырья и продукции животноводства с территорий с неблагополучной эпизоотической ситуацией и может создать риск осложнения эпидемиологической обстановки в России [2, 4, 5].

В РФ сибирская язва включена в Перечень инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории страны [6], а также отнесена к заболеваниям, представляющим опасность для окружающих [7]. Регламентированным мероприятием по предупреждению и предотвращению сибирской язвы у человека является санитарно-эпидемиологический надзор – постоянное наблюдение за эпидемическим процессом, мониторинг заболеваемости людей, животных и циркуляции возбудителя инфекции, контроль эффективности профилактических мер. При этом одной из базовых является информация о результатах лабораторной диагностики, осуществляемой специалистами учреждений Роспотребнадзора, медицинских и ветеринарных организаций, прошедшими специальное обучение на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора [8, 9]. Актуальность подготовки специалистов обусловлена также и тем, что возбудитель сибирской язвы (II группа патогенности) отнесен к категории А вероятных агентов биотерроризма [6, 10].

Обучение регламентированным методам индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций (в т.ч. сибирской язвы) в соответствии с правилами обеспечения биобезопасности осуществляют в противочумных институтах Роспотребнадзора по единой программе.

Традиционно для проведения практических занятий используют штаммы *Bacillus anthracis* II и III (вакцинный штамм) групп патогенности. Основываясь на направлении государственной политики на снижение биориска технологических процессов с использованием возбудителей инфекций и учитывая разный уровень знаний, умений и навыков безопасной работы с патогенами у слушателей курсов, актуальной и приоритетной задачей определено повышение безопасности обучающихся технологий путем замены вирулентных

штаммов сибиреязвенного микроба на авирулентные / со сниженной вирулентностью. Реализуемые в противочумных учреждениях программы профессиональной переподготовки и повышения квалификации, разработанные в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом по специальности 32.08.14 «Бактериология», включают перечень профессиональных знаний, умений и навыков, приобретаемых обучающимися, но не содержат перечня штаммов бактерий для обеспечения учебного процесса [11–13].

Цель исследования: формирование учебного набора штаммов бактерий для совершенствования методического обеспечения и снижения биологических рисков при подготовке специалистов по вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *B. anthracis* (II–III группы патогенности), *Bacillus cereus* (IV группы патогенности), штаммы микроорганизмов родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (IV группы патогенности), депонированные в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора) и отобранные на основании паспортных данных с учетом предварительно разработанных критериев.

Культуры *B. anthracis* выращивали на агаре и в бульоне Хоттингера pH 7,4 при 37°C в течение 24–48 ч. Для формирования спор культуру *B. anthracis* засеивали на скошенный агар Хоттингера pH 7,4, содержащий 60 мг% аминного азота, и культивировали при 35 ± 1°C в течение 5–7 суток [14]. Исследование проводили согласно регламентированным методам индикации, идентификации и дифференциации с применением в соответствии с инструкциями изготовителей медицинских изделий для *in vitro* диагностики, прошедших государственную регистрацию на территории РФ [8, 9, 15, 16].

Морфологию клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму, Риббергеру, Цилю–Нильсену, Леффлеру с использованием светового микроскопа «Микмед-5» («ЛОМО», Санкт-Петербург), увеличение ×400–600, масляная иммерсия. Морфологию колоний оценивали визуально и под малым увеличением светового микроскопа.

Выявление видоспецифических антигенов осуществляли методом флуоресцирующих антител (МФА) и иммунохроматографическим тестом (ИХ-тест). МФА проводили с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми и вегетативными адсорбированными сухими (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт») в соответствии с инструкцией. Просмотр МФА-мазков осуществляли посредством флуоресцентного микроскопа

Таблица 1. Биологические свойства штаммов *B. anthracis* – кандидатов в учебные
Table 1. Biological properties of *B. anthracis* strains – candidates for educational purposes

Наименование параметров / Name of parameters	Штаммы <i>B. anthracis</i> / <i>B. anthracis</i> strains				
	71/12 (2-я вакцина Ценковского) / 71/12 (2nd Tsenkovsky vaccine)	Pasteur (2-я вакцина Пастера) / (2nd Pasteur vaccine)	Sterne 34 F2	Ихтиман / Ichtiman	СТИ-1 / STI-1
Группа патогенности / Pathogenicity group	II				III
Морфология в мазках / Morphology in smears	крупные палочки, расположенные единично, попарно, цепочками, с обрубленными концами / large sticks, arranged singly, in pairs, in chains, with cut ends	крупные палочки, расположенные единично, попарно, цепочками / large sticks, arranged singly, in pairs, in chains			
Тинкториальные свойства (окраска по Граму) / Tinctorial properties (Gram staining)	Грамположительны / gram-positive				
Капсулообразование (окраска по Ребигеру) при росте на 1%-м бикарбонатно- сыровоточном агаре в присутствии CO ₂ / Capsule formation (Rebiger staining) when grown on 1% bicarbonate serum agar in the presence of CO ₂	тело микробной клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, капсула – в красно-фиолетовый / the body of the microbial cell is stained dark purple, the capsule is red-purple		тело микробной клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, капсула отсутствует / the body of the microbial cell is stained dark purple, the capsule is absent		
Капсулообразование в организме хозяина / Capsule formation in the host organism					
Спорообразование (окраска по Цилю–Нильсену) / Spore formation (Ziehl–Neelsen staining)	овальные или круглые образования розового цвета с красным ободком по периферии, расположенные центрально, не выходящие за пределы клеточной стенки / oval or round formations of pink color with a red rim around the periphery, located centrally, not extending beyond the cell wall				
Подвижность / Mobility	–	–	–	–	–
Рост в бульоне Хоттингера pH 7,4 / Growth in Hottinger broth pH 7.4	R–форма роста – придонный хлопьевидный осадок в виде «комка ваты» с прозрачным бульоном над осадком / R–form of growth – bottom flocculent sediment in the form of a “cotton ball” with a clear broth above the sediment				
Рост на агаре Хоттингера pH 7,4 / Growth on Hottinger agar pH 7.4	R–форма роста – крупные шероховатые сухие матовые колонии с «шагреновой» поверхностью и неровными краями / R–form of growth – large, rough, dry, matte colonies with a “shagreen” surface and uneven edges				
Биохимические свойства / Biochemical properties					
Ферментация субстратов до кислоты без газа: / Fermentation of substrates to acid without gas:					
Глюкоза / glucose	+	+	+	+	+
Лактоза / lactose	–	–	–	–	–
Сахароза / sucrose	+	–	+	+	+
Маннит / mannitol	–	–	–	–	–
Манноза / mannose	–	–	–	–	–
Мальтоза / maltose	+	–	+	+	+
Фосфатазная активность / Phosphatase activity	–	–	–	–	–
Лецитиназная активность / Lecithinase activity	–	–	–	–	–
Протеолитическая активность (разжижение желатины на 3–4-е сутки) / Proteolytic activity (liquefaction of gelatin on days 3–4)	+	+	+	+	+
Гемолитическая активность (лизис эритроцитов барана) / Hemolytic activity (lysis of ram red blood cells)	–	–	–	–	–
Чувствительность к сибиреязвенному диагностическому бактериофагу «Гамма A26» / Sensitivity to the anthrax diagnostic bacteriophage “Gamma A26”	+	+	+	+	+
Тест «жемчужное ожерелье» / The Pearl Necklace Test	+	+	+	+	+
Вирулентность для белых мышей (LD ₅₀) / Virulence for white mice (LD ₅₀)	6,76•10 ²	3,16•10 ²	не вызывает гибели / does not cause death		

Плазмидный состав / Plasmid composition	pXO1+, pXO2+	pXO1+, pXO2-
МФА / MFA	3+	3-4+
ИХА-тест / IHA test	+	+
Патанатомические изменения у лабораторных животных / Pathological changes in laboratory animals	типичные изменения подкожной клетчатки и внутренних органов; стабильное выделение на питательных средах <i>B. anthracis</i> из всех паренхиматозных органов и крови / typical changes in subcutaneous tissue and internal organs; stable isolation of <i>B. anthracis</i> on nutrient media from all parenchymatous organs and blood	развитие на 3–4-е сутки местных изменений подкожной клетчатки в области введения культуры <i>B. anthracis</i> , выделение на питательных средах единичных колоний <i>B. anthracis</i> из тканей лимфатического узла и селезенки / development of local changes in the subcutaneous tissue in the area of <i>B. anthracis</i> culture introduction on days 3–4, isolation of single colonies of <i>B. anthracis</i> from lymph node and spleen tissue on nutrient media

+ – положительный результат; – отрицательный результат. / + – positive result; – negative result.

Eclipse 80i (Nicon, Япония), увеличение $\times 1000$, масляная иммерсия.

Для постановки ИХ-теста использовали «Набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы» (ИХ-тест *B. anthracis*, ФБУН ГНЦ ПМБ), специфической мишенью которого является спорный антиген сибиреязвенного микроба.

Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом с использованием питательного агара Мюллера–Хинтон pH 7,3 $\pm$ 0,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ) и коммерческих дисков производства HIMEDIA (Индия). Учет и интерпретацию результатов проводили для *B. anthracis* согласно действующим нормативным документам [17], для *B. cereus* – по рекомендациям EUCAST [18, 19].

Изучение вирулентности штаммов (LD₅₀) проводили на самцах аутбредных белых мышей весом 18–20 г с последующей статистической обработкой полученных результатов по методу Кербера.

Для выявления *in vitro* генетических маркеров, участвующих в реализации патогенных свойств *B. anthracis*, использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8, 9, 15]. Гены, кодирующие основные признаки вирулентности – токсинообразование (pXO1) и капсулообразование (pXO2), определяли с использованием «Набора реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» («АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT»).

Результаты исследования и их обсуждение

Основу лабораторной диагностики составляют регламентированные схемы микробиологического анализа, предусматривающие выделение чистой культуры возбудителя инфекции и последующую идентификацию по ряду биологических свойств [8, 9, 15].

Проведение практических занятий при подготовке специалистов связано с использованием штаммов возбудителя сибирской язвы для решения следующих задач:

- изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств;

- освоение бактериологического, иммунологических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики сибирской язвы, применяемых для индикации и идентификации;

- освоение биологического метода лабораторной диагностики сибирской язвы;

- дифференциация *B. anthracis* от других патогенных микроорганизмов рода *Bacillus*, вызывающих спорадические заболевания людей.

В настоящее время в учебном процессе используют как вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1, имеющий остаточную вирулентность, так и вирулентные штаммы.

Использование вакцинного штамма в пробах для решения ситуационных задач по обнаружению патогена в объектах окружающей среды и материале от больных людей и животных обеспечивает биологическую безопасность на практических занятиях, однако позволяет изучить только часть биологических свойств – типичные видовые культурально-морфологические свойства; биохимические, антигенные, генетические особенности и чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу, характерные для данного штамма [8, 15]. Вместе с тем вызывать инфекционную болезнь у человека и животных могут также штаммы, отличающиеся от *B. anthracis* СТИ-1 по ряду биологических свойств (капсулообразование, морфология колоний, биохимические свойства) и генетических характеристик (набор генов, плазмидный профиль). Также при освоении биологического метода лабораторной диагностики заражение лабораторных животных (белых мышей) вакцинным штаммом в дозе 10⁹ спор не вызывает их гибели, не обеспечивает типичной клинической и патоморфологической картины сибиреязвенной инфекции и стабильного выделения *B. anthracis* СТИ-1 из внутренних органов биопробных животных при посеве их на питательные среды. Кроме того, учебный план включает освоение дифференциации сибиреязвенного микроба от других патогенных для человека бактерий – представителей группы *B. cereus*, вызывающих пищевые токсикоинфекции, а также генерализованную форму заболевания у лиц в послеоперационном периоде или с иммунодефицитами.

Нами были сформулированы критерии подбора штаммов бактерий для обеспечения учебного процесса:

штаммы *B. anthracis*

Таблица 2. Биологические свойства штаммов *B. cereus* – кандидатов в учебные
Table 2. Biological properties of *B. cereus* strains – candidates for educational purposes

Наименование параметров / <i>Name of parameters</i>	Штаммы <i>B. cereus</i> / <i>B. cereus strains</i>			
	ATCC 14579	504	8	var. <i>anthracoides</i> 1312
Группа патогенности / <i>Pathogenicity group</i>	IV			
Морфология в мазках / <i>Morphology in smears</i>	крупные палочки с обрубленными концами, расположенные цепочками / <i>large sticks with cut ends, arranged in chains,</i>			
Тинкториальные свойства (окраска по Граму) / <i>Tinctorial properties (Gram staining)</i>	грамположительны / <i>gram-positive</i>			
Капсулообразование (окраска по Ребигеру) при росте на 1%-м бикарбонатно-сывороточном агаре в присутствии CO ₂ / <i>Capsule formation (Rebiger staining) when grown on 1% bicarbonate serum agar in the presence of CO₂</i>	тело микробной клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, капсула отсутствует / <i>the body of the microbial cell is stained dark purple, the capsule is absent</i>			
Капсулообразование в организме хозяина / <i>Capsule formation in the host organism</i>				
Спорообразование (окраска по Цилю–Нильсену) / <i>Spore formation (Ziehl–Neelsen staining)</i>	Овальные или круглые образования розового цвета с красным ободком по периферии, расположенные центрально/субтерминально, не выходящие за пределы клеточной стенки / <i>oval or round pink formations with a red rim around the periphery, located centrally/subterminally, not extending beyond the cell wall</i>			
Подвижность / <i>Mobility</i>	+	+	+	+
Рост в бульоне Хоттингера pH 7,4 / <i>Growth in Hottinger broth pH 7.4</i>	R-форма роста – прозрачный бульон (в первые сутки возможно равномерное легкое помутнение), на дне – белый осадок, при встряхивании разбивающийся на мелкие хлопья / <i>R-form of growth – transparent broth (uniform slight turbidity is possible during the first day), at the bottom – white sediment, which breaks into small flakes when shaken</i>			
Рост на агаре Хоттингера pH 7,4 / <i>Growth on Hottinger agar pH 7.4</i>	R-форма роста – крупные шероховатые сухие матовые колонии белого цвета с неровными краями / <i>R-form of growth – large, rough, dry, matte colonies of white color with jagged edges</i>			
Биохимические свойства / <i>Biochemical properties</i>				
Ферментация субстратов до кислоты без газа: / <i>Fermentation of substrates to acid without gas:</i>				
Глюкоза / <i>glucose</i>	+	+	+	+
Лактоза / <i>lactose</i>	–	–	–	–
Сахароза / <i>sucrose</i>	+	+	–	+
Маннит/ <i>mannitol</i>	–	–	–	–
Манноза / <i>mannose</i>	+	–	+	–
Мальтоза / <i>maltose</i>	–	+	+	+
Фосфатазная активность / <i>Phosphatase activity</i>	+	+	+	+
Лецитиназная активность / <i>Lecithinase activity</i>	+	+	+	+
Протеолитическая активность (разжижение желатины на 3–4-е сутки) / <i>Proteolytic activity (liquefaction of gelatin on days 3–4)</i>	+	+	+	+
Гемолитическая активность (лизис эритроцитов барана) / <i>Hemolytic activity (lysis of ram red blood cells)</i>	+	+	+	+
Чувствительность к сибиреязвенному диагностическому бактериофагу «Гамма A26» / <i>Sensitivity to the anthrax diagnostic bacteriophage “Gamma A26”</i>	–	–	–	–
Тест «жемчужное ожерелье» / <i>The Pearl Necklace Test</i>	–	–	–	–
МФА с сибиреязвенными иммуноглобулинами / <i>FAT with anthrax immunoglobulins</i>	–	–	–	–
ИХА-тест для идентификации спор <i>B. anthracis</i> / <i>LFT for identification of B. anthracis spores</i>	–	–	–	–
+ – положительный результат; – отрицательный результат. / + – <i>positive result</i> ; – <i>negative result</i> .				

+ – положительный результат; – отрицательный результат. / + – positive result; – negative result.

- в геноме отсутствуют одна или обе основные детерминанты вирулентности (плазмида pOX1 и pOX2);
- показатель вирулентности не превышает установленный для вакцинных штаммов (LD₅₀ для белых мышей – >10 спор) [20];

- наличие типичных видовых культурально-морфологических и биохимических свойств;
- отличаются по способности образовывать капсулу в организме теплокровного хозяина и при культивировании на сывороточном агаре;

Таблица 3. Определение чувствительности штаммов – кандидатов в учебные к антибактериальным препаратам
 Table 3. Determination of the sensitivity of candidate strains in training to antibacterial drugs

Антибактериальный препарат / Antibacterial drug	<i>B. anthracis</i>						<i>B. cereus</i>		
	71/12 (2-я вакцина Ценковского) / (2 nd Tsenkovsky vaccine)	Pasteur (2-я вакцина Пастера) / (2 nd Pasteur vaccine)	Sterne 34 F2	Ихтиман / Ichtiman	СТИ-1 / STI-1	ATCC / 14579	504	8	var. <i>anthracoides</i> 1312
Ампициллин / <i>ampicillin</i>	S	S	S	I	S	R	R	R	R
Амикацин / <i>amikacin</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	I
Амоксиклав / <i>amoxiclav</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ванкомицин / <i>vancomycin</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Доксициклин / <i>doxycycline</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Окситетрациклин / <i>oxytetracycline</i>	S	S	S	R	S	I	I	I	I
Пиперацillin / <i>piperacillin</i>	I	S	I	R	I	R	R	R	R
Ципрофлоксацин / <i>ciprofloxacin</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефуроксим / <i>cefuroxime</i>	R	I	R	R	R	R	R	R	R
Цефоперазон / <i>cefoperazone</i>	S	S	S	I	I	I	I	I	I
Хлорамфеникол / <i>chloramphenicol</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Эритромицин / <i>erythromycin</i>	I	I	I	I	I	R	S	S	R

S – чувствительный; R – устойчивый, I – значения МПК с промежуточной устойчивостью находятся между значениями S- и R-культур. / S – sensitive; R – resistant, I – MIC values with intermediate resistance are between the S and R values.

- имеют различные сочетания генов вирулентности *pagA* (плазмида рОХ1) и *capA* (плазмида рОХ2) для демонстрации вариантов детекции с помощью ПЦР;
- выявляются с помощью регламентированных иммунологических методов (МФА, ИХА-тест);
- при заражении лабораторных животных формируют типичные патоморфологические изменения во внутренних органах;
- накапливаются и обеспечивают стабильное выделение бактериальной культуры при посеве на питательные среды проб всех внутренних органов и крови;
- чувствительны к антибактериальным препаратам, применяемым для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы [21];

штаммы *B. cereus*

- обладают типичными видовыми биологическими свойствами, актуальными при дифференциации с возбудителем сибирской язвы;
- чувствительны к антибактериальным препаратам, применяемым для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы.

С учетом разработанных критериев по данным паспортов были отобраны в качестве кандидатов в учебные 9 штаммов микроорганизмов, депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»): *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* Sterne 34 F2, *B. anthracis* «Ихтиман», *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского), *B. anthracis* Pasteur (2-я вакцина Пастера); *B.*

Таблица 4. Применение учебных штаммов на практических занятиях
 Table 4. Use of training strains in practical classes

Тема занятия / Lesson Topic	Название штамма / Strain
Изучение морфологических и культуральных особенностей сибиреязвенного микроба / Morphological and cultural features of the anthrax microbe	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 / <i>B. anthracis</i> 71/12
Освоение иммунологических методов лабораторной диагностики сибирской язвы (МФА, ИХА-тест) / Immunological methods of laboratory diagnostics of anthrax (FAT, LFT)	<i>B. anthracis</i> СТИ-1
Лабораторная диагностика сибирской язвы с помощью ПЦР / Laboratory diagnostics of anthrax using PCR	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. anthracis</i> 71/12
Лабораторная диагностика сибирской язвы биологическим методом / Laboratory diagnostics of anthrax using a biological method	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. anthracis</i> 71/12
Освоение методов идентификации сибиреязвенного микроба / Methods of identifying the anthrax microbe	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. anthracis</i> 71/12
Дифференциация <i>B. anthracis</i> от близкородственных микроорганизмов, выделяемых из проб клинического материала и объектов окружающей среды / Differentiation of <i>B. anthracis</i> from closely related microorganisms isolated from clinical samples and environmental objects	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. cereus</i> ATCC 14579
Приготовление проб-имитаторов ПБА для комплексного исследования объектов, подозрительных на наличие возбудителя сибирской язвы в рамках ситуационной задачи. / Preparation of PBA imitator samples for a comprehensive study of objects suspected of having anthrax pathogen within the framework of a situational task	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853

cereus ATCC 14579, *B. cereus* 504-тип, *B. cereus* 8, *B. cereus* var. *anthracoides* 1312. Проведен анализ биологических свойств, значимых для лабораторной диагностики, регламентированных методами (табл. 1, 2), а также оценка чувствительности к антибактериальным препаратам, применяемым для профилактики и лечения сибирской язвы [17] (табл. 3).

По результатам анализа биологических свойств сформирован набор, включающий авирулентный штамм *B. anthracis* СТИ-1, штамм *B. anthracis* 71/12, обеспечивающие всестороннее изучение вопросов микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы, а также штамм *B. cereus* ATCC 14579 для освоения дифференцирования сибиреязвенного микроба от близкородственных патогенных для человека бацилл.

На основании данных о вирулентности *in vivo* разработан дифференцированный подход к использованию штаммов *B. anthracis* для снижения вероятности лабораторного инфицирования в ходе приобретения навыков выполнения микробиологических манипуляций при освоении слушателями курсов регламентированных методов индикации и идентификации в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика сибирской язвы» (табл. 4). Наиболее безопасный штамм *B. anthracis* СТИ-1 используют для индивидуальной работы слушателей курсов на всех этапах лабораторного исследования.

При изучении морфологических и культуральных особенностей сибиреязвенного микроба *B. anthracis* СТИ-1 демонстрирует свойства штаммов, не формирующих капсулу в организме хозяина и при культивировании на бикарбонатно-сыровоточном агаре, а *B. anthracis* 71/12 – штаммов, образующих капсулу.

При освоении метода ПЦР в схеме лабораторной диагностики сибирской язвы на практических занятиях используют штаммы с разным набором видоспецифичных генов: авирулентный вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 (содержит ген *pagA* (pXO1⁺) и не имеет ген *capA* (pXO2⁻)) и *B. anthracis* 71/12 (содержит ген *pagA* (pXO1⁺) и ген *capA* (pXO2⁺)).

При освоении биологического метода исследования в схеме лабораторной диагностики сибирской язвы кроме вакцинного используют вирулентный штамм *B. anthracis* 71/12. Данный штамм применяют преподаватели для заблаговременного заражения лабораторных животных с целью демонстрации ярко выраженных патоморфологических изменений подкожной клетчатки и внутренних органов. При посевах на плотные питательные среды из всех внутренних органов и крови животных выделяют культуру возбудителя сибирской язвы.

Для идентификации штаммов данные о типичных морфологических и культуральных свойствах дополняют результатами изучения ряда признаков: подвижность, способность к капсулообразованию *in vitro* и *in vivo*, спорообразование, чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам, лецитиназная активность, гемолитическая активность в отношении эритроцитов барана, фосфатазная активность, чувствительность к пенициллину [8, 9, 15]. При изучении алгоритма видовой идентификации возбудителя сибирской язвы на практических занятиях используют бескапсульный авирулентный вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 и капсульный *B. anthracis* 71/12.

Освоение методов дифференциации *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов, выделяемых из проб клинического материала и объектов окружающей среды, проводят путем сравнения свойств *B. anthracis* СТИ-1 и *B. cereus* ATCC 14579, обладающего типичными свойствами данной группы. Дифференциацию проводят на основании ряда физиолого-биохимических признаков: а) рост бактериальной культуры на плотных и в жидких питательных средах; б) наличие подвижности при 37°C; в) наличие лецитиназной активности; г) наличие гемолитической активности в отношении эритроцитов барана; д) наличие фосфатазной активности; е) отсутствие чувствительности к сибиреязвенному бактериофагу «Гамма А-26»; ж) отсутствие чувствительности к пенициллину; з) результаты иммунологических реакций (МФА, ИХ-тест) и ПЦР с использованием имеющих государственную регистрацию наборов реагентов для выявления и идентификации возбудителя сибирской язвы [8, 9, 15].

Учитывая тематический план учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика сибирской язвы», целесообразно включить в учебный набор штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (IV группы патогенности) в качестве «фоновых» микроорганизмов для приготовления проб-имитаторов ПБА-объектов окружающей среды (воды поверхностных водоемов, почвы, смывов с поверхностей), пищевых продуктов и клинического материала (гнояного отделяемого из карбункула, мокроты, испражнений больного и иное).

Заключение

Таким образом, разработанный учебный набор штаммов бактерий позволяет обеспечить в полном объеме реализацию планов практических занятий, обучающимся самостоятельно на авирулентном вакцинном штамме *B. anthracis* СТИ-1 приобрести навыки работы с возбудителем сибирской язвы и освоить в полном объеме регламентированные методы индикации, идентификации и дифференциации *B. anthracis*. Кроме того, использование авирулентного вакцинного штамма позволяет минимизировать вероятность лабораторного инфицирования обучающихся, тем самым снизить биологический риск практических занятий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. Руководство для врачей. Под ред. Онищенко ГГ, Дармова ИВ, Борисевича СВ. Изд. 2-е, испр. и доп. Сергиев Посад, 2018.

2. Рязанова АГ, Скударева ОН, Герасименко ДК, Семенова ОВ, Аксенова ЛЮ, Еременко ЕИ, и др. Анализ ситуации по сибирской язве в 2019 г., прогноз на 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2020;2:57-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-57-61
3. Рязанова АГ, Скударева ОН, Герасименко ДК, Логвин ФВ, Аксенова ЛЮ, Семенова ОВ, и др. Анализ ситуации по сибирской язве в 2022 г. в мире, прогноз на 2023 г. в Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;2:88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94
4. Никифоров ВВ, Сорокина НА. Сибирская язва в Российской Федерации в 2023 году: два случая из практики. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2023;6(28):387-400. DOI: 10.17816/EID623060
5. Куличенко АН, Буравцева НП, Рязанова АГ, Еременко ЕИ. Сибирская язва на Северном Кавказе. Под ред. Куличенко АН. Майкоп: Качество, 2016;14-20.
6. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Приложения 1, 11. СанПиН 3.3686-21 утв. Главным государственным санитарным врачом РФ, 2021.
7. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих: постановление Правительства РФ от 01.12.2004 №715 (изм. 31.01.2021). Режим доступа: <https://base.garant.ru/12137881/> (дата обращения 03.06.2024).
8. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язви. Методические указания МУК 4.2.2413-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009;69.
9. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язви для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания МУК 4.2.2941-11. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011;55.
10. Воробьев АА, Боев ВВ, Бондаренко ВМ, Гинцбург АЛ. Проблема биотерроризма в современных условиях. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002;3:3-12.
11. Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами I–II групп: программа профессиональной переподготовки. Саратов, 2021.
12. Бактериология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации: программа повышения квалификации. Саратов, 2021;45.
13. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой: программа повышения квалификации. Саратов, 2022;39.
14. Дятлов ИА, Кутырев ВВ, Храмов МВ. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М., 2012;206.
15. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство. Под ред. Онищенко ГГ, Кутырева ВВ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико», 2013.
16. Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неуставленного систематического положения. Методические рекомендации МР 3.1.0129-18. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019;62.
17. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чумы, сибирской язви, холеры, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза) к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2.2495-09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010;59.
18. Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Год утверждения: 2024. МАКМАХ, СГМУ: Смоленск, 2024.
19. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024-01-01. This document should be cited as "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Bacillus* spp. except *B. anthracis*. Available at: https://heiomed.de/wp-content/uploads/2024/01/Breakpoint_Tables-01.01.2024.pdf (accessed 26.06.2-24).
20. Фармакопейная статья ФС 42 «Вакцина сибиреязвенная комбинированная». ОФС «Иммунобиологические лекарственные средства» 24.09.2013. Режим доступа: <https://base.garant.ru/70457452/236230d7c8d87d8ae97576229da0a012/> (дата обращения 26.06.2024).
21. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Ющука НД, Венгеровой ЮЯ. 3-е изд., перераб. и доп. Серия «Национальные руководства». М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021;409-420. DOI: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104

References

1. Sibirskaya yazva: aktual'nye problemy razrabotki i vnedreniya meditsinskikh sredstv zashchity. Rukovodstvo dlya vrachei. Pod red. Onishchenko GG, Darmova IV, Borisevicha SV. Izd. 2-e, ispr. i dop. Sergiev Posad, 2018. (In Russian).
2. Ryazanova AG, Skudareva ON, Gerasimenko DK, Semenova OV, Aksenova LYu, Eremenko EI, et al. Analysis of the Situation on Anthrax in 2019, the Forecast for 2020. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2020;2:57-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-57-61 (In Russian).
3. Ryazanova AG, Skudareva ON, Gerasimenko DK, Logvin FV, Aksenova LYu, Semenova OV, et al. Analysis of the Situation on Anthrax in the World in 2022, the Forecast for the Russian Federation for 2023. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2023;2:88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94 (In Russian).
4. Nikiforov VV, Sorokina NA. Malignant anthrax in Russian Federation in 2023: two case reports. Epidemiology and Infectious Diseases. 2023;6(28):387-400. DOI: 10.17816/EID623060 (In Russian).
5. Kulichenko AN, Buravtseva NP, Ryazanova AG, Eremenko EI. Sibirskaya yazva na Severnom Kavkaze. Pod red. Kulichenko AN. Maikop: Kachestvo, 2016;14-20. (In Russian).
6. Sanitarно-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei. Prilozheniya 1, 11. SanPiN 3.3686-21 utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF, 2021. (In Russian).
7. Ob utverzhdenii perechnya sotsial'no znachimykh zabolevaniy i perechnya zabolevaniy, predstavlyayushchikh opasnost' dlya okruzhayushchikh: postanovlenie Pravitel'stva RF ot 01.12.2004 №715 (izm. 31.01.2021). Available at: <https://base.garant.ru/12137881/> (accessed 03.06.2024). (In Russian).
8. Laboratornaya diagnostika i obnaruzhenie vozбудitelya sibirskoi yazvy. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2413-08. M.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2009;69. (In Russian).
9. Poryadok organizatsii i provedeniya laboratornoi diagnostiki sibirskoi yazvy dlya laboratorii territorial'nogo, regional'nogo i federal'nogo urovnei. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2941-11. M.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2011;55. (In Russian).
10. Vorob'ev AA, Boev BV, Bondarenko VM, Gintsburg AL. Problem of bioterrorism under modern conditions. Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology. 2002;3:3-12. (In Russian).
11. Bakteriologiya. Osnovy bezopasnoi raboty s patogennymi biologicheskimi agentami I–II grupp: programma professional'noi perepodgotovki. Saratov, 2021. (In Russian).
12. Bakteriologiya. Infektsionnye bolezni, trebuyushchie provedeniya meropriyatii po sanitarnoi okhrane territorii Rossiiskoi Federatsii: programma povysheniya kvalifikatsii. Saratov, 2021;45. (In Russian).
13. Epidemiologicheskii nadzor za sibirskoi yazvoi: programma povysheniya kvalifikatsii. Saratov, 2022;39. (In Russian).
14. Dyatlov IA, Kutyrev VV, Khramov MV. Pitatel'nye sredy dlya vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikatsii vozбудitelei osobo opasnykh infektsii bakterial'noi prirody. M., 2012;206. (In Russian).

15. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh boleznei: prakticheskoe rukovodstvo. Pod red. Onishchenko GG, Kutryeva VV. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: ZAO «Shiko», 2013. (In Russian).
16. Poryadok organizatsii i provedeniya indikatsii patogennykh biologicheskikh agentov, v tom chisle neustanovlennogo sistematicheskogo polozheniya. Metodicheskie rekomendatsii MR 3.1.0129-18. M.: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchiya cheloveka, 2019;62. (In Russian).
17. Opredelenie chuvstvitel'nosti vozbuditelei opasnykh bakterial'nykh infektsii (chumy, sibirskoi yazyvy, kholery, tulyaremii, brutselleza, sapa i melioidoza) k antibakterial'nym preparatam: metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2495-09. M.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2010;59. (In Russian).
18. Rossiiskie rekomendatsii. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Versiya 2024-02. God utverzhdeniya: 2024. MAKMAX, SGMU: Smolensk, 2024. (In Russian).
19. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024-01-01. This document should be cited as "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Bacillus* spp. except *B. anthracis*. Available at: https://heiomed.de/wp-content/uploads/2024/01/Breakpoint_Tables-01.01.2024.pdf (accessed 26.06.2-24). (In Russian).
20. Farmakopeinaya stat'ya FS 42 «Vaktsina sibireyazvennaya kombinirovannaya». OFS «Immunobiologicheskie lekarstvennye sredstva» 24.09.2013. Available at: <https://base.garant.ru/70457452/236230d7c8d87d8ae97576229da0a012/> (accessed 26.06.2024). (In Russian).
21. Infektsionnye bolezni: natsional'noe rukovodstvo. Pod red. Yushchuka ND, Vengerova YuYa. 3-e izd. pererab. i dop. Seriya «Natsional'nye rukovodstva». M.: GEOTAR-Media Publ., 2021;409-420. DOI: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104 (In Russian).

Информация о соавторах:

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Ляшова Ольга Юрьевна, научный сотрудник отдела Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Tatiana A. Malyukova, MD, PhD, Leading Researcher of the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

Yury A. Popov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, chief researcher of the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

Olga Yu. Lyashova, researcher at the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

ChIP-mini: протокол ChIP-ехо с низким уровнем входных данных для выяснения динамики связывания ДНК-белков во внутриклеточных патогенах

Геномная идентификация профилей связывания для ДНК-связывающих белков из ограниченного числа внутриклеточных патогенов в исследованиях инфекций имеет решающее значение для понимания вирулентности и клеточных процессов, но остается сложной задачей, поскольку текущий ChIP-ехо разработан для бактериальных клеток с высоким входным уровнем ($>10^{10}$). Разработан оптимизированный метод ChIP-mini, низковоходной ChIP-ехо, использующий в 5000 раз меньшее количество исходных бактериальных клеток и аналитический конвейер, для определения динамики связывания ДНК-связывающих белков в патогенах, инфицированных хозяином, по всему геному. Применяя ChIP-mini к внутриклеточным *Salmonella Typhimurium*, идентифицировали 642 и 1837 сайтов связывания H-NS и RpoD соответственно, выявив изменения в их позиции связывания и интенсивности связывания во время инфекции. После заражения наблюдали 21 значительное снижение связывания H-NS в межгенных областях, обнажая промоторную область генов вирулентности, таких как в островах патогенности *Salmonella-2*, 3 и эффекторах. Кроме того, выявили важный феномен, заключающийся в том, что новые и значительно увеличенные связывания RpoD были обнаружены в областях, демонстрирующих уменьшенное связывание H-NS, тем самым способствуя существенной регуляции генов вирулентности. Эти результаты значительно расширяют понимание того, как H-NS и RpoD одновременно координируют инициацию транскрипции генов вирулентности в макрофагах. Эта работа демонстрирует широко адаптируемый инструмент, который позволит выяснить динамику связывания ДНК-белков у различных внутриклеточных патогенов во время инфекции.



Park JY, Jang M, Choi E, Lee SM, Bang I, Woo J, et al.

ChIP-mini: a low-input ChIP-exo protocol for elucidating DNA-binding protein dynamics in intracellular pathogens. *Nucleic Acids Res.* 2025 Jan 24;53(3):gkaf009. DOI: 10.1093/nar/gkaf009

Частота обнаружения грибов рода *Fusarium* у пациентов с заболеваниями кожи и слизистых оболочек

П.Е.Гуляев^{1,2}, С.А.Лисовская^{1,2}, Г.Ш.Исаева^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация;

²ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация

Цель данного исследования: проведение анализа региональных особенностей динамики и частоты встречаемости грибов рода *Fusarium* у пациентов с поверхностными формами поражений кожи и слизистых, проживающих в Республике Татарстан.

Материалы и методы. Для проведения исследований использовали биологический материал, взятый от пациентов, находившихся на амбулаторном лечении с различными заболеваниями кожи или слизистых оболочек.

Результаты. Был проведен анализ частоты встречаемости грибов *Fusarium* spp. за период 2016–2020 гг. Также приводятся данные по локализации микозов, ассоциированных с грибами рода *Fusarium*.

Выводы. Полученные результаты отражают существенный рост количества случаев микозов, ассоциированных с *Fusarium* spp., за исследуемый период.

Ключевые слова: *Fusarium*, микозы, онихомикоз, кератит

Для цитирования: Гуляев П.Е., Лисовская С.А., Исаева Г.Ш. Частота обнаружения грибов рода *Fusarium* у пациентов с заболеваниями кожи и слизистых оболочек. Бактериология. 2025; 10(1): 100–104. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-100-104

Frequency of detection of *Fusarium* fungi in patients with skin and mucous membrane diseases

P.E.Gulyaev^{1,2}, S.A.Lisovskaya^{1,2}, G.Sh.Isaeva^{1,2}

¹Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation;

²Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation

Purpose. The purpose of this study is to analyze regional features of the dynamics and frequency of occurrence of fungi of the genus *Fusarium* in patients with superficial forms of lesions of the skin and mucous membranes living in the Republic of Tatarstan.

Materials and methods. For the research we used biological material taken from patients undergoing outpatient treatment with various diseases of the skin or mucous membranes.

Results. An analysis of the frequency of occurrence of *Fusarium* spp. for the period from 2016 to 2020. Data on the localization of mycoses associated with fungi of the genus *Fusarium* were also presented.

Conclusions. The results obtained reflect a significant increase in the number of cases of mycoses associated with *Fusarium* spp. for the period under study.

Key words: *Fusarium*, mycoses, onychomycosis, keratitis

For citation: Gulyaev P.E., Lisovskaya S.A., Isaeva G.Sh. Frequency of detection of *Fusarium* fungi in patients with skin and mucous membrane diseases. Bacteriology. 2025; 10(1): 100–104. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-100-104

Для корреспонденции:

Гуляев Павел Евгеньевич, старший преподаватель кафедры микробиологии им. акад. В.М.Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории микологии ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора

Адрес: 420012, Казань, ул. Бултерова, 49

Телефон: (843) 236-5200

E-mail: gulyaev.pavel@kazangmu.ru

Статья поступила 12.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Pavel E. Gulyaev, Senior Lecturer, Academician V.M.Aristovsky Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation; Junior researcher at the mycology laboratory of the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Address: 49 Butlerov str., 420012, Kazan, Russian Federation

Phone: (843) 236-5200

E-mail: gulyaev.pavel@kazangmu.ru

The article was received 12.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

В настоящее время доказательство этиологической значимости условно-патогенных грибов в патогенезе заболеваний человека является сложной задачей для медицинской микологии. Проблема заключается в том, что не существует однозначно непатогенных микромицет: любой гриб может вызвать инфекцию у человека с ослабленным иммунитетом, и микроорганизм нельзя сразу же исключать из этиологии заболевания как контаминант.

Биология грибов рода *Fusarium* связана с условиями среды обитания, поэтому необходимо в первую очередь определить области (локусы) колонизации макроорганизма данными грибами, которые зависят от локализации повреждений кожи, слизистых оболочек и иммуносупрессии макроорганизма. *Fusarium*, как сообщалось различными исследователями ранее, вызывает в основном поверхностные инфекции, такие как кератит [1–4] и онихомикоз [4, 5]. У пациентов с ослабленным иммунитетом этот патоген вызывает генерализованные формы, что приводит к системной и инвазивной инфекции [6–9]. Обычно считается, что инфицирование *Fusarium* происходит при вдыхании конидий, а также контактным путем через поврежденные ткани [1, 10, 11], поэтому инфекции, вызываемые *Fusarium*, изначально были описаны в тропических и субтропических странах с жарким климатом, в основном в агропромышленных регионах. В недавних исследованиях сообщалось о повышении частоты случаев кератита также в регионах со средне-умеренным климатом [9] и среди городского населения в связи с широким использованием контактных линз [1–4].

Цель данного исследования: проведение анализа региональных особенностей динамики и частоты встречаемости грибов рода *Fusarium* у пациентов с поверхностными формами поражений кожи и слизистых оболочек.

Материалы и методы

Проанализировали результаты микологических исследований пациентов с заболеваниями кожи и слизистых оболочек, проведенных на базе лаборатории микологии ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора в 2016–2020 гг. В анализируемую группу были включены пациенты, находившиеся на амбулаторном лечении с различными заболеваниями кожи или слизистых оболочек (онихомикозы, дерматиты, кератиты, конъюнктивиты и т.д.). Микроскопию и микологический посев проводили в двух повторностях, учитывая различные температурные режимы для выращивания грибов (37°C и 28°C). От всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании, при этом для лиц младше 18 лет информированное согласие было получено от законных представителей несовершеннолетних. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом учреждения (протокол №4, утвержденный 12.11.2015).

Отделяемое слизистых оболочек (зева, цервикального канала, конъюнктивы глаза) отбирали тампоном из гигроскопической ваты, который помещали в стерильную пробирку. Кожные чешуйки соскабливали скальпелем с периферических участков места поражения, ногтевые чешуйки – из глубоких слоев пораженной ногтевой пластины, собирали в стерильную чашку Петри.

Посев полученного материала проводили двумя способами:

- материалы суспендировали в стерильном физиологическом растворе (0,9%-й раствор NaCl) до разведения 10^1 – 10^6 по Макфарланд и высевали по 0,1 мл на чашки с агаром Сабуро (HiMedia, Индия), содержащим 50 МЕ хлорамфеникола для подавления роста бактерий;
- посев материала без разведения на 3 точки в центре чашки. При данном методе рост микромицетов в двух и трех точках определяется как диагностически значимый, в одной точке – как случайный (рис. 1).

Виды грибов идентифицировали по макроморфологическим (культуральным) признакам (структура колоний, поверхность, пигментация колоний гриба и субстрата) и микроморфологическим свойствам (субстратный и воздушный мицелий, септы, характер спороношения) [12]. Для исключения возможной транзитной контаминации пациентов, у которых при первичном посеве были выделены грибы рода *Fusarium*, приглашали на повторный отбор биоматериала через 5–7 дней.

У штаммов, выделенных при вторичном высеве, определяли таксономическую принадлежность с помощью молекулярно-генетической идентификации с использованием рибосомных генов (18S рДНК) с применением праймеров 5,8SR (5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3') и ITS4R (5'-CCTCCGCTTA TTGATATGC-3') [13].

Статистическую значимость результатов оценивали с использованием теста Манна–Уитни с порогом значимости при $p < 0,05$ в Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Достоверность

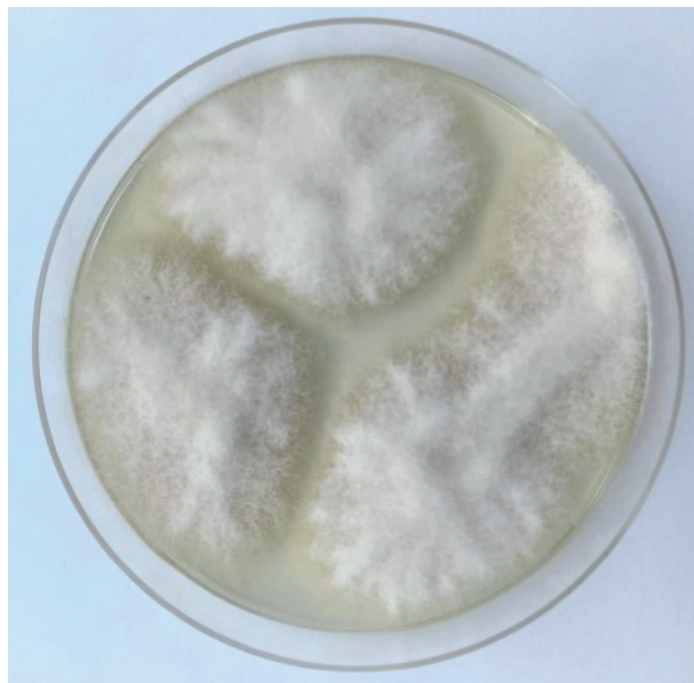


Рис. 1. Монокультура штамма *Fusarium solani*, выделенного из кожного покрова пациента. Посев на плотной среде Сабуро в 3 точках без разведения; культивирование 5 суток при 30°C. Колонии хлопьевидные, обильный воздушный мицелий белого цвета; кремовая пигментация реверса.

Fig. 1. Monoculture of *Fusarium solani* strain isolated from the patient's skin. Sowing on dense Sabouraud medium in 3 points without dilution; cultivation for 5 days at 30°C. Flocculent colonies, abundant white aerial mycelium; cream pigmentation of the reverse.

разницы частот оценивали по критерию χ^2 ($p < 0,05$). ROC-анализ использовали для оценки диагностической силы прогноза продолжительности заболевания с помощью подсчета количества выросших колоний.

Результаты

Частота встречаемости грибов *Fusarium* spp.

Провели анализ 18 260 микологических исследований биоматериала пациентов за период с 2016 по 2020 г. У 476 (2,6%) пациентов в посеве были обнаружены грибы рода *Fusarium*. При проведении повторного микробиологического исследования у 290 (60,9%) пациентов с тех же локусов только у 54 (18,9%) пациентов были вновь обнаружены грибы рода *Fusarium*.

Всех пациентов ($n = 54$), у которых были выявлены грибы рода *Fusarium*, распределили на 7 возрастных групп: 0–3 года (раннее детство), 4–6 лет (дошкольный возраст), 7–17 лет (школьный возраст), 18–44 года (молодой возраст), 45–59 лет (средний возраст), 60–74 года (пожилой возраст), 75 и более лет (старческий возраст).

За изучаемый период выявили увеличение частоты встречаемости грибов рода *Fusarium*. Так, при первичном посеве частота встречаемости *Fusarium* spp. увеличилась в 14,2 раза: с 0,5% в 2016 г. до 7,1% в 2020 г. (рис. 2B), а при вторичных посевах – в 12,5 раза: с 0,42% в 2016 г. до 5,25% в 2020 г. ($p < 0,01$) (рис. 2D).

В биоматериалах с первичного посева у пациентов в возрасте от 18 до 44 лет грибы рода *Fusarium* обнаружены в 59,7% случаев, тогда как среди детей (0–3 года и 4–6 лет) и лиц пожилого возраста (60 лет и старше) таких случаев было <5% для каждой возрастной группы (рис. 2A). Примечательно, что при вторичном посеве биоматериала среди всех выделенных культур грибы рода *Fusarium* обнаружены у пациентов среднего возраста (45–59 лет) в 48,1% случаев, а у лиц пожилого возраста (60–74 года) – в 20,4% (рис. 2A).

Необходимо отметить, что с 2016 по 2020 г. наибольший прирост (в 19,6 раза) встречаемости грибов при первичном посеве наблюдался у пациентов 18–44 лет, а при вторичном посеве у пациентов среднего возраста (44–59 лет) этот показатель вырос в 12 раз: с 1,85% в 2016 г. до 22,2% в 2020 г.

Наибольший прирост встречаемости грибов при первичном посеве наблюдали у пациентов в возрасте 18–44 лет – в 19,6 раза, а при вторичном посеве выявили пророст в 12 раз у пациентов в возрасте 44–59 лет.

Локализация микоза, ассоциированного с *Fusarium* spp.

Грибы рода *Fusarium* в 80,5% (383/476) случаев при первичном и в 66,6% (36/54) случаев при вторичном посеве были выделены с кожи и ее придатков (рис. 3). Необходимо отметить, что в 44,1% (211/383) случаев при первичном и 38,8% (21/33) случаев при вторичном посеве данные микромицеты были обнаружены на поверхности ногтевой пластины, преимущественно стоп.

В 19,5% (93/476) случаев при первичном посеве грибы рода *Fusarium* были выявлены на слизистых оболочках, преимущественно зева (66/93; 13,9%), тогда как при вторичном

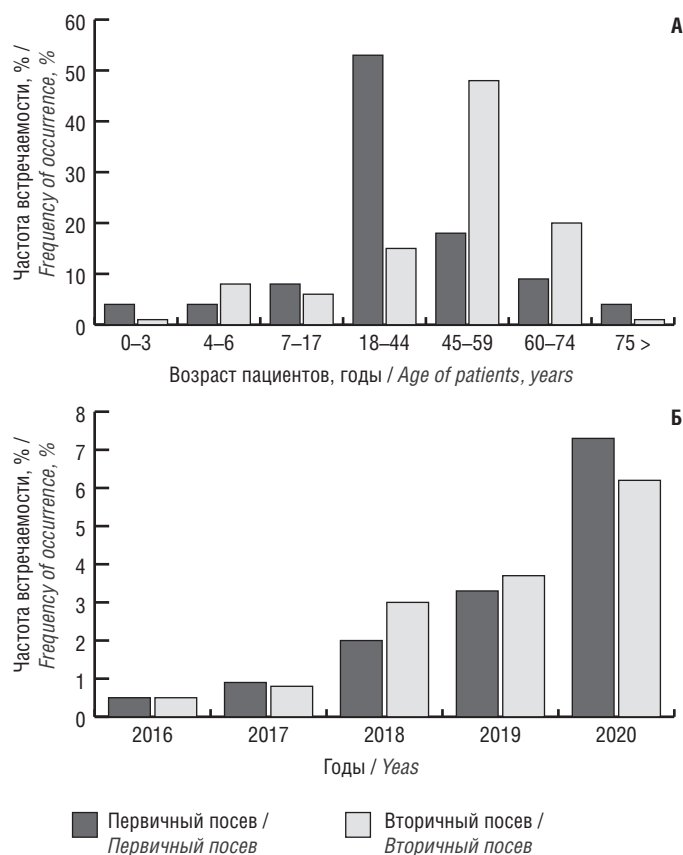


Рис. 2. Частота встречаемости грибов рода *Fusarium* в зависимости от возраста пациента (A) и года анализа (B).
Fig. 2. Frequency of occurrence of *Fusarium* fungi depending on the patient's age (A) and the year of analysis (B).

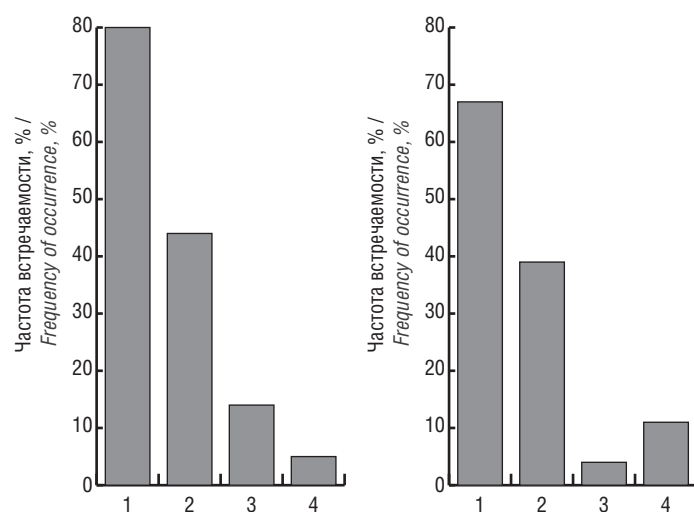


Рис. 3. Частота встречаемости грибов рода *Fusarium* в биоматериале из различных локусов при первичном (слева) и вторичном (справа) посевах: 1 – кожа, 2 – ногти, 3 – глотка, 4 – глаза.
Fig. 3. Frequency of occurrence of fungi of the genus *Fusarium* in biomaterial from different loci during primary (left) and secondary (right) cultures: 1 – skin, 2 – nails, 3 – pharynx, 4 – eyes.

посеве среди 18 (33,3%) пациентов только у 2 (3,7%) в зеве были обнаружены данные микромицеты. Оба пациента более года состояли на учете у врача-аллерголога с диагнозом «бронхиальная астма» и пользовались ингалятором для купирования приступов астмы.

При первичном высеве в 5,6% (27/476) случаев были выявлены *Fusarium* spp. на конъюнктиве глаза, у 6 (11,1%) пациентов из 21 повторно сдавших анализ данные микромицеты были выделены и при вторичном посеве.

Согласно нашим данным, 11 (68,7%) пациентов, на конъюнктиве глаза которых при повторном высеве были обнаружены *Fusarium* spp., длительно использовали мягкие контактные линзы.

Видовая идентификация грибов рода *Fusarium*

Штаммы грибов, выделенные от пациентов при вторичном посеве, относились к 5 видовым комплексам (species complex/SC): *F. solani* (FSSC), *F. oxysporum* (FOSC); *F. fujikuroi* (FFSC): *F. verticillioides*, *F. proliferatum*; *F. chlamydosporum* (FCSC); *F. sambucinum* (FSAMSC): *F. sporotrichoides*. Среди 54 изученных штаммов 6 (11,1%) изолятов были определены только до рода. Доминирующие виды были отнесены к видовым комплексам *F. solani* (29/54; 53,7%) и *F. oxysporum* (11/54; 20,3%). Представители видового комплекса *F. chlamydosporum* были выявлены на ногтевой поверхности стоп 2 (3,7%) пациентов. *F. sporotrichoides*, относящийся к видовому комплексу *F. sambucinum* (FSAMSC), был выделен из ногтевой пластины только одного пациента с длительным рецидивирующим онихомикозом.

Обсуждение

Согласно получаемым сообщениям от разных групп исследователей, грибы рода *Fusarium* во всем мире признаны патогеном для человека с широким спектром клинических проявлений [14]. Грибы *Fusarium* spp. обладают эффективными механизмами распространения в окружающей среде, что приводит к широкому распространению микроорганизма в человеческой популяции. Проведенное нами исследование указывает на возможность грибов рода *Fusarium* играть роль в патологии человека. Проведенный нами анализ результатов микологического исследования биоматериала пациентов, проживающих на территории Республики Татарстан, подтверждает тенденцию увеличения случаев выявления *Fusarium* spp. с 2016 по 2020 г. Наиболее часто *Fusarium* spp. обнаруживали у пациентов поздней весной и ранней осенью. В зимний период грибы рода *Fusarium* выявлялись в 2 раза меньше, чем в летнее время. Преимущественная осенне-весенняя сезонность заболеваний может быть связана с биологическими свойствами данного микроорганизма – хорошим ростом этих грибов во влажных условиях и распространением их конидий ветром и осадками. В целом виды *Fusarium* предпочитают влажные условия, где активность воды выше 0,86, и способны хорошо расти при температуре от 0 до 37°C.

В ходе проведенной видовой идентификации клинических изолятов было показано, что наиболее распространенными комплексами в регионе являлись *F. solani* и *F. oxysporum*. Грибы рода *Fusarium* являются одним из первых групп микромицетов, у которых термин «видовой комплекс» использовался для обозначения близкородственных видов. Данный термин был применен в клинической практике на основе ранних работ M.Chen et al. [15] и K.J.Kwon-Chung et al. [16], как монофилетическая группа, в отношении видов, которые

на молекулярно-эпидемиологическом уровне различаются, но функционально неразличимы. Согласно глобальной базе данных Index Fungorum (speciesfungorum.org), род *Fusarium* включает 301 вид, сгруппированных в 22 видовых комплекса [17], и предполагается, что 74 таксономических вида способны вызывать инфекции у людей [18]. Полученные нами данные согласуются с данными литературы, где в биоматериале преобладали видовые комплексы FSSC и FOSC [19]. В биообразцах от пациентов, обратившихся в лабораторию КНИИЭМ, при вторичном посеве, где степень обсемененности составляла 10⁴ КОЕ/мл, доминирующим видом являлся *F. solani*. Надо отметить, что *F. solani* встречался во всех локусах макроорганизма, тогда как *F. oxysporum* не был отмечен в ногтях. Представители других видовых комплексов в протестированных образцах были выявлены у пациентов с длительным течением инфекционного процесса различной этиологии в незначительном количестве – <15%.

Проведенный нами анализ локализации *Fusarium* spp. в макроорганизме показал, что наиболее часто грибок контаминировал две зоны: кожу и ногти, что, возможно, обусловлено благоприятным сочетанием как экологических факторов (температуры, влажности), так и предрасполагающих факторов со стороны макроорганизма в результате наличия микро- и макротравм, приводящих к нарушению целостности и функции эпидермиса. Согласно литературным данным, кожа является частым биотопом проникновения данных микромицетов [20]. Стоит отметить, что распространение грибка наблюдалось в основном у пациентов с ослабленным иммунитетом, с длительным течением инфекционного процесса различной этиологии. У иммунокомпетентных лиц поражения кожи обычно локализовались и развивались после повреждения кожи в месте заражения. В ногтях грибы рода *Fusarium* встречались в 40,7% случаях, часто значение степени обсемененности составляло 10² КОЕ/мл. В недавнем исследовании J.Galletti et al. на модели онихомикоза показана способность *Fusarium* spp. разрушать роговой слой ногтей и использовать его в качестве единственного источника питательных веществ для роста и размножения, что позволяет предположить, что *Fusarium* spp., подобно дерматофитам, также является кератинолитическим микромицетом [21]. Данные микромицеты могут поражать роговицу и переднюю камеру глаза, где в области зрачков они образуют радужно-грибковую массу, которая влияет на дренаж влаги и вызывает повышение внутриглазного давления, что приводит к грибковому кератиту и глаукоме [2]. В нашей работе показано, что 11 (68,7%) пациентов, на конъюнктиве глаза которых при повторном высеве были обнаружены *Fusarium* spp., длительно использовали мягкие контактные линзы, которые могли травмировать слизистую конъюнктивы глаза и, таким образом, способствовать грибковой адгезии и инвазии.

Выводы

Полученные нами данные демонстрируют значительный рост встречаемости *Fusarium* spp. у пациентов в Республике Татарстан за период 2016–2020 гг. Выявление инфицирования грибами рода *Fusarium* имеет осенне-весеннюю сезонность, что, возможно, связано с биологическими особенностями микроорганизма и определенными факторами передачи. Среди

пациентов с грибковыми поражениями кожи и слизистых оболочек преобладали лица наиболее трудоспособного возраста – от 18 до 44 лет (53%), что может быть обусловлено более высокой социальной активностью данной возрастной группы. Причинами роста выявления случаев заболеваний, ассоциированных с грибами рода *Fusarium*, могут быть также более широкое использование контактных линз, снижение иммунной защиты у населения, большая настороженность врачей по поводу грибковых инфекций и, как следствие, улучшение лабораторной диагностики. Принимая во внимание, что виды *Fusarium* могут выступать в роли оппортуниста в качестве вторичного инфекционного агента при наличии предрасполагающих факторов, осложняющих течение основного заболевания, необходимы дальнейшие исследования факторов патогенности грибов *Fusarium* и изучение их симбиотических взаимодействий с другими видами микроорганизмов.

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 that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Al-Hatmi AM, Meis JF, de Hoog GS. *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. PLoS Pathog. 2016 Apr 7;12(4):e1005464. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005464
2. Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. Fungi that Infect Humans. Microbiol Spectr. 2017 Jun;5(3):10.1128/microbiolspec.funk-0014-2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016
3. Walther G, Stasch S, Kaerger K, Hamprecht A, Roth M, Cornely OA, et al. *Fusarium* Keratitis in Germany. J Clin Microbiol. 2017 Oct;55(10):2983-2995. DOI: 10.1128/JCM.00649-17
4. Pérez-Nadales E, Alastruey-Izquierdo A, Linares-Sicilia MJ, Soto-Debrán JC, Abdala E, García-Rodríguez J, et al.; Spanish Fusariosis Study Group. Invasive Fusariosis in Nonneutropenic Patients, Spain, 2000–2015. Emerg Infect Dis. 2021 Jan;27(1):26-35. DOI: 10.3201/eid2701.190782
5. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32(12):1491-500. DOI: 10.1007/s10096-013-1924-7
6. Van Diepeningen AD, Feng P, Ahmed S, Sudhadham M, Bunyaratavej S, de Hoog GS. Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics. Mycoses. 2015;58(1):48-57. DOI: 10.1111/myc.12273
7. Willinger B. Emerging Fungi and Diagnosis of Fungal Infections: Current Knowledge and New Developments. J Fungi (Basel). 2021 Apr 19;7(4):316. DOI: 10.3390/jof7040316
8. Batista BG, Chaves MA, Reginatto P, Saraiva OJ, Fuentefria AM. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53:e20200013. DOI: 10.1590/0037-8682-0013-2020
9. Tortorano AM, Prigntano A, Esposto MC, Arsic Arsenijevic V, Kolarovic J, Ivanovic D, et al; ECMM Working Group. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Sep;33(9):1623-30. DOI: 10.1007/s10096-014-2111-1
10. Ploetz RC. *Fusarium* Wilt of Banana. Phytopathology. 2015 Dec;105(12):1512-21. DOI: 10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW
11. Garnica M, Nucci M. Epidemiology of Fusariosis. Curr Fungal Infect Rep. 2013;7:301-305. DOI: 10.1007/s12281-013-0161-y
12. Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Iowa. 2006. DOI: 10.1002/9780470278376
13. Herkert PF, Al-Hatmi AMS, de Oliveira Salvador GL, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, et al. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility of Clinical *Fusarium* Species From Brazil. Front Microbiol. 2019 Apr 10;10:737. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00737
14. Al-Hatmi AM, de Hoog GS, Meis JF. Multiresistant *Fusarium* Pathogens on Plants and Humans: Solutions in (from) the Antifungal Pipeline? Infect Drug Resist. 2019 Nov 28;12:3727-3737. DOI: 10.2147/IDR.S180912
15. Chen M, Zeng J, De Hoog GS, Stielow B, Gerrits Van Den Ende AH, Liao W, et al. The 'species complex' issue in clinically relevant fungi: A case study in *Scedosporium apiospermum*. Fungal Biol. 2016 Feb;120(2):137-46. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.09.003
16. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The case for adopting the "species complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. mSphere. 2017;2:e00357-16. DOI: 10.1128/mSphere.00357-16
17. Herkert PF, Al-Hatmi AMS, de Oliveira Salvador GL, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, et al. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility of Clinical *Fusarium* Species From Brazil. Front Microbiol. 2019 Apr 10;10:737. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00737
18. O'Donnell K, Ward TJ, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM, Kang S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. Phytoparasitica. 2015;43:583-595. DOI: 10.1007/s12600-015-0484-z
19. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clin Microbiol Rev. 1994;7:479-504. DOI: 10.1128/CMR.7.4.479
20. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis. 2002 Oct 15;35(8):909-20. DOI: 10.1086/342328
21. Galletti J, Negri M, Grassi FL, Kioshima-Cotica ES, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. is able to grow and invade healthy human nails as a single source of nutrients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34:1767-1772. DOI: 10.1007/s10096-015-2410-1

Информация о соавторах:

Лисовская Светлана Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии им. акад. В.М.Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Исаева Гузель Шавхатовна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой микробиологии им. акад. В.М.Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; заместитель директора по инновационному развитию ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Svetlana A. Lisovskaya, PhD in Biological Sciences, associate professor of the Academician V.M.Aristovsky Department of Microbiology, Kazan State Medical University

Guzel Sh. Isaeva, MD, PhD, DSc, Associate Professor, Head of the Academician V.M.Aristovsky Department of Microbiology, Kazan State Medical University; Deputy Director for Innovative Development of the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Характеристика и клиническое значение бактерий *Raoultella* spp.

О.М.Соболева, А.С.Кравченко

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, Российская Федерация

Представлены характеристики бактерий рода *Raoultella* семейства *Enterobacteriaceae*. Описаны морфологические, культуральные, биохимические свойства, факторы патогенности значимых для медицины и биологии видов *R. ornithinolytica*, *R. planticola*, *R. terrigena*. Отмечен ряд их физиологических особенностей. Приведены некоторые данные об истории изучения данных представителей, сведения о врожденной и приобретенной антибиотикорезистентности, рассмотрены экологические характеристики. Описаны многочисленные клинические случаи инфицирования бактериями рода *Raoultella*, а также сообщения о выделении бактерии из различных биотопов организма человека. Виды, относящиеся к роду *Raoultella*, могут представлять опасность для людей с ослабленным иммунитетом, хроническими заболеваниями, вызывая нозокомиальные инфекции. Подчеркивается необходимость дальнейшего изучения и совершенствования методов идентификации бактерий рода *Raoultella*.

Ключевые слова: *Raoultella*, *Raoultella ornithinolytica*, факторы патогенности, вирулентность, нозокомиальные инфекции

Для цитирования: Соболева О.М., Кравченко А.С. Характеристика и клиническое значение бактерий *Raoultella* spp. Бактериология. 2025; 10(1): 105–111. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-105-111

Characteristics and clinical significance of *Raoultella* spp. bacteria

O.M.Soboleva, A.S.Kravchenko

Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation

The characteristics of representatives of the genus *Raoultella* of the *Enterobacteriaceae* family are presented. Morphological, cultural, biochemical properties, pathogenicity factors of *R. ornithinolytica*, *R. planticola*, and *R. terrigena* species important for medicine and biology are described. A number of their physiological features are noted. Some data on the history of the study of these representatives are presented, environmental characteristics are considered, information on congenital and acquired antibiotic resistance is provided. Numerous clinical cases of infection with bacteria of the genus *Raoultella*, as well as isolation of bacteria from various biotopes of the human body, have been described. There is no doubt that species belonging to the genus *Raoultella* can pose a danger to people with weakened immune systems and chronic diseases. It has been established that representatives of the genus *Raoultella* cause nosocomial infections. The need for further study and improvement of methods for the identification of bacteria of the genus *Raoultella* is emphasized.

Key words: *Raoultella*, *Raoultella ornithinolytica*, pathogenicity factors, virulence, nosocomial infections

For citation: Soboleva O.M., Kravchenko A.S. Characteristics and clinical significance of *Raoultella* spp. bacteria. Bacteriology. 2025; 10(1): 105–111. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-105-111

С течением времени некоторые типичные сапротрофные и условно-патогенные бактерии приобретают все большее значение в инфекционной патологии человека, что подтверждается растущим числом научных публикаций в виде описаний клинических случаев, метаанализов, обзоров. Род *Raoultella* еще недостаточно изучен по сравнению с другими представителями *Enterobacterales*. Однако в последние годы появляется все больше сообщений о случаях выделения *Raoultella* spp. из биотопов организма

человека, а также заражения этими бактериями и прямой связи с целым рядом патологических инфекционных состояний. Генетическое сходство между *Raoultella* spp. и *Klebsiella* spp. и недостаточные знания практикующих врачей о новом патогене могут приводить к неправильной его идентификации.

Цель исследования: описание биологических и патогенных особенностей относительно нового возбудителя инфекционных болезней человека – бактерий рода *Raoultella*.

Для корреспонденции:

Соболева Ольга Михайловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 650056, Кемерово, ул. Ворошилова, 22а

Телефон: (3842) 73-28-71

Статья поступила 10.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Olga M. Soboleva, PhD in Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Kemerovo State Medical University

Address: 22a Voroshilov str., Kemerovo, 650056, Russian Federation

Phone: (3842) 73-28-71

The article was received 10.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Общая характеристика рода *Raoultella*

Raoultella – это капсульная грамотрицательная, оксидазо-отрицательная, каталазоположительная аэробная (по данным других источников, факультативно-анаэробная [1]) неподвижная палочка, образующая биопленку, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae*. Первоначально эта бактерия была отнесена к роду *Klebsiella* и названа *Klebsiella ornithinolytica* из-за множества общих экологических, биохимических, клинических и микробиологических особенностей (выработка каталазы, отсутствие оксидазы, ферментация глюкозы, лактозы, сорбозы и восстановление нитратов до нитритов, распространенность в объектах внешней среды и др.). Однако в дальнейшем, благодаря углубленному филогенетическому тестированию, включающему анализ последовательности 16S рРНК и β -субъединицы РНК-полимеразы, кодирующей ген *rpoB*, а также гены *gyrA* и *gyrB* [2], в 2001 г. этих бактерий выделили в отдельный род *Raoultella*.

Род *Raoultella* назван в честь Дидье Рауля (Didier Raoult), французского бактериолога из Медицинского университета в Марселе, Франция [3]. В настоящее время род *Raoultella* включает в себя 3 вида: *R. ornithinolytica*, *R. planticola*, *R. terrigena* [4]. В некоторых источниках упоминается и четвертый вид – *Raoultella electrica* [5, 6], а отдельными авторами и вовсе предлагается провести реклассификацию родов *Klebsiella* и *Raoultella* и вновь объединить их на основе чрезвычайно высокого генетического сходства или, по крайней мере, переименовать вид *Raoultella electrica* в вид *Klebsiella electrica* [7]. Таким образом, в настоящее время систематическое положение рода продолжает уточняться.

R. planticola чаще всего выделяют из растений (травы, свежие овощи), древесины, воды и почвы, реже от животных; *R. terrigena* в основном выделяют из почвы, реже – из образцов клинического материала, взятого у пациентов. *R. ornithinolytica* чаще всего выделяют из рыбы [8], клещей, термитов и воды [9, 10], сточных вод [11]; вид обладает способностью продуцировать орнитиндекарбоксилазу, что отражено в видовом названии патогена.

Как и ее более известный родственник *Klebsiella*, *Raoultella* spp. распространена в природе повсеместно, встречается в растениях, воде и почве и колонизирует организмы людей и животных. Описаны случаи выделения представителей рода из микробиома кишечника комаров [12], пробиотических йогуртов [13]. *R. ornithinolytica* – относительно новый вид в инфекционной патологии людей. Растет число сообщений о нозокомиальных инфекциях у пациентов с сопутствующей патологией, относящихся к группе риска. По-видимому, это связано, в том числе, с совершенствованием инструментов идентификации.

Как указывалось выше, роды *Klebsiella* и *Raoultella* весьма похожи, однако существуют некоторые метаболические особенности, которые могут быть использованы для их идентификации: индолный тест, рост при +10°C, выработка гистамина, тест на D-мелезитозу и метаболизм орнитина, разложение пектата, производство пигмента на глюконат-железоцитратном агаре и использование гентизата в гидроксibenзоате в качестве единственного источника углерода [14, 15]. Кроме того, в отличие от бактерий рода *Klebsiella*, *Raoultella* spp. растут при температуре 4°C и не выделяют газ при ферментации лактозы при температуре +44,5°C [16]. Эти физиологические и биохимические свойства могут быть использо-

ваны для идентификации, основанной на культуральном методе микробиологической диагностики.

Raoultella – неприхотливый микроорганизм, может расти на простых питательных средах. Благодаря синтезу полисахаридной капсулы изучаемый род бактерий способен формировать большие слизистые колонии на агаре МакКонки. Ферментирует глюкозу и лактозу до кислоты и газа. Реакция Фогеса–Проскауэра положительна; бактерия утилизирует цитрат и малонат, сероводород не выделяет.

Бактерия длительно сохраняется в объектах внешней среды, например в больничной пыли, что может играть важную роль в передаче инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [17, 18].

Факторы патогенности *Raoultella*

Raoultella spp. обладает целым рядом факторов патогенности, причем некоторые из них могут быть видо- и штаммоспецифичными. К доказанным факторам патогенности у бактерий *Raoultella* spp. относятся липополисахарид, гемогглютинины, адгезины (фимбрии 1-го и 3-го типов), сидерофоры (энтеробактин и иногда аэробактин), бактериоцин [1, 19], внеклеточные протеазы, гистамин [20]. Выработка экзополисахаридов и образование биопленки наблюдались у *R. planticola*, а экспрессия бактериоцинов была описана у *R. ornithinolytica* [21]. У *R. terrigena* был описан тетродотоксин, мощный нейротоксин рыбы фугу [22].

Большинство видов рода *Raoultella* обычно проявляют высокую чувствительность к антибиотикам, однако у них существует врожденная устойчивость к пенициллинам из-за экспрессии хромосомноопосредованной β -лактамазы класса А по классификации Эмблера: PLA-1, ORN-1 и TER-1 у *R. planticola*, *R. ornithinolytica* и *R. terrigena* соответственно [21]. Подобно близкородственной *Klebsiella* spp., *R. ornithinolytica* обладает склонностью к приобретению дополнительных генов устойчивости к антибиотикам (ARGs), что приводит к увеличению частоты выделения штаммов этого вида с множественной лекарственной устойчивостью [23].

Отдельные штаммы могут иметь более широкий вирулентный потенциал, чем уже описанные общеродовые и общевидовые факторы патогенности. Так, у штамма *R. ornithinolytica* WM1, выделенного от пациента и обладающего множественной лекарственной устойчивостью (из 15 изученных антибиотиков чувствителен только к двум), идентифицированы генетические элементы, связанные с вирулентностью, которые кодируют фимбрии 1-го типа, системы секреции II и VI типов, иерсиниабактин, энтеробактин и поверхностный полисахарид [24].

Не вызывает сомнений способность представителей рода *Raoultella* образовывать биопленку, вступая в сложные взаимоотношения с другими видами бактерий. В модельном эксперименте на мышах показано, что штамм *R. ornithinolytica* B1645-1, выделенный из крови пациента и несущий R-плазмиду, может влиять на состав кишечной микробиоты, изменяя соотношение *Firmicutes/Bacteroidota* и увеличивая относительную численность лактобактерий и бацилл через 48 ч [25].

Значение *Raoultella* в инфекционной патологии человека

Большинство указаний об инфицировании человека *R. ornithinolytica* касается оппортунистических инфекций у

лиц с ослабленным иммунитетом и пациентов, подвергающихся инвазивным процедурам (например, с постоянными катетерами) [26, 27]. Колонизация пищеварительного тракта штаммами *Raoultella* происходит в основном у пациентов со сниженным иммунитетом (пациенты после инвазивных процедур, трансплантации костного мозга, имеющие опухоли, а также новорожденные, пожилые люди), во время длительной госпитализации (несколько недель), ранее получавших антибиотики широкого спектра действия (карбапенемы, гликопептиды, колистин) и противогрибковые препараты. Инфекции, вызываемые *Raoultella*, в основном представляют собой внутрибольничные пневмонии, однако также упоминаются случаи цистита, холангита, холецистита и целлюлита [28, 29].

Среди наиболее значимых факторов иммуносупрессии при инфекции *Raoultella* отмечают онкологические заболевания и сахарный диабет [21], а среди инвазивных вмешательств – катетеризацию периферических и центральных вен, мочевого пузыря, искусственную вентиляцию легких [29–31]. Преимущественная локализация инфекции, вызванной *Raoultella*, – желудочно-кишечный тракт, мочевыделительная система и дыхательные пути, нередко возбудитель выделяется при инфекциях кровотока [32]. Множественный тропизм возбудителя проявляется казуистическими случаями менингита, конъюнктивита, синусита и наружного отита [33, 34]. Интраоперационное заражение *Raoultella* spp. встречается реже, однако выделенные в таких случаях штаммы характеризуются выраженной антибиотикорезистентностью преимущественно за счет продукции карбапенемазы [3].

Бактерия рода *Raoultella* может обнаруживаться в различных биотопах организма человека. Так, она выделяется из фекалий пациентов с атопическим дерматитом и сопутствующим дисбиозом кишечника [35, 36], с атопическим дерматитом и нарушением микробиоты верхних дыхательных путей [37].

Raoultella обнаруживается в материале цервикального канала у пациенток при преждевременном разрыве плодных оболочек [38], с преждевременными родами [39].

Бактерия изучаемого рода выделена из различных отделов респираторного тракта: назофарингеальных мазков у пациентов с пневмонией [40, 41], отделяемого околоносовых пазух у пациентов с хроническим риносинуситом [42], мокроты у больных туберкулезом [43], материала нижних отделов респираторного тракта у пациентов с муковисцидозом [44, 45], бронхоальвеолярного лаважного содержимого у больных вирусно-бактериальной пневмонией [46].

Отмечены отдельные случаи выделения бактерий рода *Raoultella* из желчи у пациентов с механической желтухой опухолевого генеза [47], крови больного уросепсисом [48], мочи при пересадке почек [49, 50], в мазках со слизистой оболочки прямой кишки пациентов с острыми миелоидными лейкозами и лимфомами [51].

Зарегистрирован случай послеоперационной внутрибрюшной инфекции *R. ornithinolytica* после панкреатодуоденэктомии Уиппла: в подпеченочной перитонеальной жидкости автором идентифицирован мультирезистентный штамм, содержащий ген нью-делийской металло- β -лактамазы (*blaNDM*) [52]. В обзоре случаев бактериемии *R. ornithinolytica* [53] сообщается о 7 пациентах с инфекцией желчевыводя-

щих путей. Сообщается о клиническом случае бактериемии и хронического холецистита, вызванных *R. planticola* [54]. Зарегистрированные случаи желудочно-кишечных, в частности билиарных, инфекций, вызванных *R. ornithinolytica*, часто описываются как поражающие главным образом иммунокомпрометированных в результате либо злокачественного новообразования, либо хронического заболевания лиц. Тем не менее существуют редкие случаи инфицирования здоровых пациентов без каких-либо идентифицируемых факторов риска, которое обычно проявляется в виде пищевых отравлений, острого гастроэнтерита [55, 56]. Бактерии рассматриваемого нами рода можно обнаружить в составе микробиоценозов слизистых зева и прямой кишки относительно здоровых людей [57].

Случаи инфекций мочевыводящих путей, а также костно-суставных инфекций, вызванных *R. ornithinolytica*, очень редки [3]. В 2024 г. впервые зарегистрирован случай дакриоцистита, вызванного *R. planticola* [58].

На фоне массы тревожных сообщений о растущем значении бактерии в инфекционной патологии человека вызывают беспокойство экологические исследования, в которых сообщается об успешном применении представителей данного таксона для ремедиации почв и других субстратов, загрязненных тяжелыми металлами [59–61]. Учитывая высокую способность всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* к горизонтальному переносу генов, не получим ли мы в итоге эффективный ремедиант, успешно распространяющий гены резистентности к антибиотикам среди бактерий, в том числе и патогенных, и вносящий собственный существенный вклад в инфекционную заболеваемость человека? Тем более что имеются исследования, доказывающие прямое влияние антибиотиков на ряд свойств энтеробактерий, и рассматриваемый нами в данной статье род в том числе, выделенных из объектов окружающей среды. Так, указывается, что антибиотики, добавляемые в концентрации ниже минимальной ингибирующей, снижают скорость роста, уменьшают образование сидерофоров и биопленок, увеличивают выработку поверхностных полисахаридов, вызывают значительные изменения морфологии бактерий, однако повышают при этом экспрессию гена *rfaH*, являющегося регулятором многих оперонов вирулентности у бактерий [6].

Заключение

Бактерии рода *Raoultella* являются новым возбудителем инфекционных болезней человека. Хотя ранее они были известны как относительно безвредные условно-патогенные бактерии, обнаруживаемые в объектах внешней среды, их участие в разнообразных клинических инфекциях человека, зафиксированное множеством исследователей, проливает свет на потенциально все более вирулентный патоген, поражающий пациентов из групп риска. Бактерии, выделяемые в большинстве описанных в литературе случаев, восприимчивы к стандартным схемам лечения антибиотиками. Однако появление штаммов с множественной лекарственной устойчивостью может представлять серьезный риск для иммунокомпрометированных пациентов и, следовательно, требует пристального внимания клиницистов. Это актуально еще и в связи с тем, что эпидемиология и клиническая значимость инфекций, вызываемых *Raoultella* spp. у человека, неясны и

требуют дальнейших исследований. Существовавшие ранее трудности с распознаванием *Raoultella* и внедрение более точных методов идентификации могут объяснить недавнее увеличение числа сообщений о случаях заболевания. Предполагается, что *Raoultella* spp. может быть скорее недостаточно диагностированным, чем редким патогеном.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Bilihar D, Phuu P, Kotelnikova S, Johnson E. Bacteremic cholangitis due to *Raoultella planticola* complicating intrahepatic bile duct stricture 5 years post-laparoscopic cholecystectomy: a case report. *J Med Case Rep*. 2021 Apr 7;15(1):152. DOI: 10.1186/s13256-021-02762-0
2. Sękowska A. The many faces of *Raoultella* spp. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 2019;73:713-720. DOI: 10.5604/01.3001.0013.6377
3. Hajjar R, Ambaraghassi G, Sebahang H, Schwenter F, Su SH. *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and Resistance. *Infect Drug Resist*. 2020 Apr 15;13:1091-1104. DOI: 10.2147/IDR.S191387
4. Taxonomy Browser [Electronic resource]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=160674> (accessed 13.05.2024).
5. Abd El-Ghany WA. A spotlight on *Raoultella ornithinolytica*: a newly emerging life-threatening zoonotic pathogen. *Int J of One Health*. 2021;7(1):1-6. DOI: 10.14202/IJOH.2021.1-5
6. Delik E, Eroğlu B, Tefon-Öztürk BE. Evaluation of the in vitro effects of concentrations of antibiotics on three Enterobacteriaceae isolates. *World J Microbiol Biotechnol*. 2024 Jan 19;40(2):73. DOI: 10.1007/s11274-023-03877-w
7. Ma Y, Wu X, Li S, Tang L, Chen M, An Q. Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Res Microbiol*. 2021 Sep-Oct;172(6):103851. DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103851
8. Долганова СГ, Нохрина ЕВ. Санитарно-микробиологическая оценка пресноводной рыбы. *Вестник ИРГСАХ*. 2019;90:131-139.
9. Загайнова АВ, Юдин СМ, Абрамов ИА, Недачин АЕ, Асланова ММ, Лукашина МВ и др. Определение перечня потенциально патогенных и патогенных микроорганизмов бактериальной, вирусной и паразитарной природы, циркулирующих в сточных и поверхностных водах. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2021;2:50-63. DOI: 10.33092/0025-8326mp2021.2.50-63
10. Загайнова АВ, Асланова ММ, Курбатова ИВ, Ракова ВМ, Федец ЗЕ, Пай ГВ, и др. Оптимизация методов санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического контроля сточных вод. *Гигиена и санитария*. 2022;101(5):545-555. DOI: 10.47470/0016-9900-2022-101-5-545-555
11. Puljko A, Babić I, Rozman SD, Barišić I, Jelić M, Maravić A, et al. Treated municipal wastewater as a source of high-risk and emerging multidrug-resistant clones of *E. coli* and other Enterobacterales producing extended-spectrum β -lactamases. *Environ Res*. 2024 Feb 15;243:117792. DOI: 10.1016/j.envres.2023.117792
12. Бурлак ВА, Федорова ВС, Кириленко КМ, Воробьев РС, Коханенко АА, Артемов ГН. Микробиом кишечника комаров-переносчиков диروفиларий. Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тезисы докладов Второй Всероссийской научной конференции с международным участием. Иркутск, 28 февраля 2022 года. Иркутск: Иркутский государственный университет, 2022;123-126.
13. Qu T, Wang P, Zhao X, Liang L, Ge Y, Chen Y. Metagenomics reveals differences in the composition of bacterial antimicrobial resistance and antibiotic resistance genes in pasteurized yogurt and probiotic bacteria yogurt from China. *J Dairy Sci*. 2024 Jun;107(6):3451-3467. DOI: 10.3168/jds.2023-23983
14. Mori M, Ohta M, Agata N, Kido N, Arakawa Y, Ito H, et al. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. *Microbiol Immunol*. 1989;33(11):887-95. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1989.tb00976.x
15. Westbrook GL, O'Hara CM, Roman SB, Miller JM. Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr;38(4):1495-7. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1495-1497.2000
16. Sękowska A. *Raoultella* spp.-clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiol (Praha)*. 2017 May;62(3):221-227. DOI: 10.1007/s12223-016-0490-7
17. Чезганова ЕА, Ефимова ОС, Созинов СА, Ефимова АР, Сахарова ВМ, Кутихин АГ и др. Больничная пыль как потенциальный резервуар госпитальных штаммов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2019;18(4):82-92. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-82-92
18. Чезганова ЕА, Медведева НВ, Сахарова ВМ, Брусина ЕБ. Эпидемический процесс инфекций дыхательных путей и роль пыли как фактора передачи мультирезистентных микроорганизмов в медицинских организациях. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020;6(1):47-52. DOI: 10.23946/2500-0764-2020-5-1-47-52
19. Podschun R, Fischer A, Ullman U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. *J Med Microbiol*. 2000 Feb;49(2):115-119. DOI: 10.1099/0022-1317-49-2-115
20. Al-Hulu SM, Al-Charrakh AH, Al-Saadi MAK. Isolation and characterization of *Raoultella ornithinolytica* from clinical specimens in Hilla city. *Iraq. Med J Babylon*. 2009;7(4):42-47.
21. Appel TM, Quijano-Martínez N, De La Cadena E, Mojica MF, Villegas MV. Microbiological and Clinical Aspects of *Raoultella* spp. *Front Public Health*. 2021 Aug 2;9:686789. DOI: 10.3389/fpubh.2021.686789
22. Yu VC, Yu PH, Ho KC, Lee FW. Isolation and identification of a new tetrodotoxin-producing bacterial species, *Raoultella terrigena*, from Hong Kong marine puffer fish *Takifugu niphobles*. *Mar Drugs*. 2011;9(11):2384-2396. DOI: 10.3390/md9112384
23. Salimiyan rizi K, Farsiani H. *Raoultella* Infections from Clinical to Laboratory – Update & Literature review. *Reviews in Clinical Medicine*. 2022;9(4):159-171. DOI: 10.22038/rcm.2023.68403.1416
24. Wang M, Fan Y, Liu P, Liu Y, Zhang J, Jiang Y. Genomic insights into evolution of pathogenicity and resistance of multidrug-resistant *Raoultella ornithinolytica* WM1. *Ann N Y Acad Sci*. 2021 Aug;1497(1):74-90. DOI: 10.1111/nyas.14595
25. Wu Z, Gou R, Sha L, Yu C, Meng L, Jin Z. Effects of Luteolin-7-O-Glucoside on Intestinal Microbiota Dysbiosis and Drug Resistance Transmission Caused by *Raoultella ornithinolytica* B1645-1: Modulating the Composition of Intestinal Microbiota and Promoting the Transfer of blaNDM-1 Gene from Genus *Enterococcus* to *Lactobacillus* in Mice. *Microorganisms*. 2023 Oct 2;11(10):2477. DOI: 10.3390/microorganisms11102477
26. Zou H, Berglund B, Xu H, Chi X, Zhao Q, Zhou Z, Xia H, Li X, Zheng B. Genetic characterization and virulence of a carbapenem-resistant *Raoultella ornithinolytica* isolated from well water carrying a novel megaplasmid containing blaNDM-1. *Environ Pollut*. 2020 May;260:114041. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114041
27. Сухорукова МВ, Эйдельштейн МВ, Иванчик НВ, Склеенова ЕЮ, Шайдуллина ЭР, Азизов ИС и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования марафон 2015-2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):147-159. DOI: 10.36488/смас.2019.2.147-159

28. Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY. Low virulence? Clinical characteristics of *Raoultella planticola* bacteremia. *Infection*. 2014 Oct;42(5):899-904. DOI: 10.1007/s15010-014-0664-7
29. Seng P, Boushab BM, Romain F, Gouriet F, Bruder N, Martin C, et al. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. *Int J Infect Dis*. 2016 Apr;45:65-71. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.02.014
30. Sękowska A, Dylewska K, Gospodarek E, Bogiel T. Catheter-related blood stream infection caused by *Raoultella ornithinolytica*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015 Nov;60(6):493-5. DOI: 10.1007/s12223-015-0390-2
31. Chen X, Zhou X, Cao J, Ma K, Xia Z. A case report of community-acquired *Raoultella ornithinolytica* infection in a healthy, young individual. *BMC Infect Dis*. 2021 Oct 24;21(1):1095. DOI: 10.1186/s12879-021-06799-w
32. Hong KW, Cheon YH, Moon K, Hong SI, Ryu BH, Cho OH, et al. Comparison of the clinical characteristics and outcomes of bloodstream infections caused by *Raoultella* species and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis (Lond)*. 2020 Jul;52(7):489-497. DOI: 10.1080/23744235.2020.1758764
33. Cavaliere M, Bartoletti G, Capriglione P, Di Lullo AM, Motta G, Iengo M, et al. Unusual Localization of an Emergent Bacterium, *Raoultella ornithinolytica*. *Case Rep Med*. 2020 Mar 30;2020:1710271. DOI: 10.1155/2020/1710271
34. Baek J, Park MJ, Lee HY, Kang S. *Raoultella Ornithinolytica* in a Healthy, Young Person: Rapidly Progressive Sinusitis with Orbital and Intracranial Involvement. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2023 Sep 18;10(10):003987. DOI: 10.12890/2023_003987
35. Зайнуллина ОН, Печуров ДВ, Лямин АВ, Хисматуллина ЗР. Коррекция нарушений биоценоза кишечника в комплексной терапии atopического дерматита у детей. *Вопросы практической педиатрии*. 2019;14(2):81-86. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-2-81-86
36. Зайнуллина ОН, Печуров ДВ, Лямин АВ, Хисматуллина ЗР. Характеристика микробиома основных биотопов у детей с atopическим дерматитом. *Педиатрия им. Г.Н.Сперанского*. 2020;99(2):74-80. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-2-74-80
37. Жестков АВ, Лямин АВ, Побежимова ОО. Оценка культурома отделяемого верхних дыхательных путей и содержимого толстой кишки у пациентов с atopическим дерматитом. *Вестник современной клинической медицины*. 2022;15(1):17-25. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).17-25
38. Каганова МА, Спиридонова НВ, Казакова АВ, Девятова ОО, Галкина ДА, Головина ОН. Особенности микробиоты цервикального канала при дородовом излитии околоплодных вод и доношенной беременности. *Акушерство и гинекология*. 2019;5:77-84. DOI: 10.18565/aig.2019.5.77-84
39. Перепелица СА. Микробиологический мониторинг матери и ребенка в ближайшем послеродовом периоде. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2021;23(S1):32-33.
40. Шмыленко ВА, Бондаренко АП, Троценко ОЕ, Пшеничная НЮ, Громова ТВ. Бактериальная микробиота респираторного тракта больных внебольничной пневмонией, выделенная при их первичном и повторном обследовании в период пандемии новой коронавирусной инфекции (декабрь 2020 г. – март 2021 г.) в г. Хабаровске. *Проблемы медицинской микологии*. 2021;23(2):165.
41. Троценко ОЕ, Бондаренко АП, Шмыленко ВА, Базыкина ЕА, Пшеничная НЮ, Зайцева ТА, и др. Бактериальная микрофлора респираторного тракта, выявленная у больных внебольничной пневмонией в период продолжающегося распространения новой коронавирусной инфекции в г. Хабаровске (декабрь 2020 – март 2021 г.). *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(4):713-725. DOI: 10.15789/2220-7619-COR-1839
42. Еременко ЮЕ, Таланкина АС, Титов ЛП, Сиделова СИ, Шестакова ЕВ, Носова ЕС. Хронические риносинуситы: микробный пейзаж и способность к формированию биопленок. *Оториноларингология. Восточная Европа*. 2019;9(4):427-435.
43. Ауезов АШ, Чингисова ЛТ, Ракишева АС, Бисмилда ВЛ, Нурбаева КЖ, Шамурова ЗМ. Характер неспецифической микрофлоры у больных туберкулезом. *Фтизиопульмонология*. 2021;2:32-36.
44. Красовский СА, Амелина ЕЛ, Кондратьева ЕИ, Шагинян ИА, Чернуха МЮ, Черняк АВ, и др. Респираторная инфекция нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным Национального регистра (2014). *Пульмонология*. 2016;26(4):421-435. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-421-435
45. Баранов АА, Намазова-Баранова ЛС, Куцев СИ, Авдеев СН, Полевиченко ЕВ, Белевский АС, и др. Педиатрическая фармакология. 2022;19(2):153-195. DOI: 10.15690/pf.v19i2.2417
46. Кецо ЮЛ, Петровская ЕВ, Лямин АВ. Эффективность использования антибактериальной терапии разных групп тяжести пациентов с вирусно-бактериальной пневмонией в пандемическом и постпандемическом периоде 2009/2011 года. *Тольяттинский медицинский консилиум*. 2015;3-4:25-29.
47. Шабунин АВ, Тавобилов ММ. Выбор способа декомпрессии желчных протоков в лечении больных механической желтухой опухолевого генеза. *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П.Павлова*. 2016;24(1):68-74.
48. Третьякова НА, Суханин ВС, Вдовушкина ТА. Спондилит как осложнение перенесенного уросепсиса и инфекционного эндокардита (клиническое наблюдение). *РМЖ*. 2020;28(8):37-40.
49. Волыничек ЕП, Большаков ЛВ, Балакирев ЭМ, Богомолова НС. Профилактика и лечение инфекционных осложнений, вызванных нозокомиальной флорой, после пересадки родственных аллогенных почек. *Трансплантология*. 2011;(2-3):63-68. DOI: 10.23873/2074-0506-2011-0-2-3-63-68
50. Волыничек ЕП, Большаков ЛВ, Богомолова НС, Балакирев ЭМ. Клинические и бактериологические особенности инфекционных осложнений у реципиентов родственных почек. *Трансплантология*. 2013;1:18-24.
51. Коробова АГ, Клясова ГА, Охмат ВА, Кравченко СК, Паровичникова ЕН, Савченко ВГ. Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией β-лактамаз расширенного спектра при лечении острых миелоидных лейкозов и лимфом. *Гематология и трансфузиология*. 2017;62(3):116-123. DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-3-116-123
52. Bhatt P, Tandel K, Das NK, Rath KR. New Delhi metallo-β-lactamase producing extensively drug-resistant *Raoultella ornithinolytica* isolated from drain fluid following Whipple's pancreaticoduodenectomy. *Med J Armed Forces India*. 2015 Dec;71(Suppl 2):S609-11. DOI: 10.1016/j.mjafi.2015.01.005
53. Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY. Clinical characteristics of *Raoultella ornithinolytica* bacteremia. *Infection*. 2015 Feb;43(1):59-64. DOI: 10.1007/s15010-014-0696-z
54. Doherty G, Kreinices J, Souza F, Kim DE. Chronic cholecystitis from *Raoultella planticola* infection associated with adenomyomatous hyperplasia. *J Surg Case Rep*. 2022 Nov 28;2022(11):rjac529. DOI: 10.1093/jscr/rjac529
55. Hajjar R, Schwenter F, Su SH, Gasse MC, Sebahang H. Community-acquired infection to *Raoultella ornithinolytica* presenting as appendicitis and shock in a healthy individual. *J Surg Case Rep*. 2018 May 15;2018(5):rjy097. DOI: 10.1093/jscr/rjy097
56. Бондаренко АП, Будацыренова ЛВ, Игнатъева МЕ, Шмыленко ВА, Троценко ОЕ, Дятлов ИА. Групповые случаи полиэтиологичной пищевой токсикоинфекции в Республике Саха (Якутия) в августе 2018 года, связанные с употреблением рыбных консервов. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2020;39(39):85-92.
57. Катаева ЛВ, Степанова ТФ, Ребещенко АП, Посоюзных ОВ, Ху ТХД, Ле ТМХ. Сравнительная характеристика микробиоценоза слизистых зева и прямой кишки пациентов Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, СРВ. *Инфекция и иммунитет*. 2017;S:932.
58. Kalogeropoulos D, Asproudis C, Priavali E, Pappa C, Kalogeropoulos C, Asproudis I. A novel case of *Raoultella planticola* – associated acute dacryocystitis. *Orbit*. 2024 Feb;43(1):157-159. DOI: 10.1080/01676830.2022.2089168
59. Salih LIF, Rasheed RO, Muhammed SM. *Raoultella ornithinolytica* as a Potential Candidate for Bioremediation of Heavy Metal from Contaminated Environments. *J Microbiol Biotechnol*. 2023 Jul 28;33(7):895-908. DOI: 10.4014/jmb.2212.12045

60. Ghosh S, Sarkar B, Thongmee S. Bacteria mediated cadmium removal for wastewater treatment. Development in Wastewater Treatment Research and Processes. Elsevier, 2024;137-156. DOI: 10.1016/B978-0-323-99278-7.00001-8
61. Li C, Xing J, Xu Q, Cui D, Liu Y, Pang C, Li A. Biochar and microorganism assisted phytoremediation of severely molybdenum-contaminated soil: Efficacy, mechanisms and the impact of low temperatures. J of Cleaner Production. 2024;444:141219. DOI: 10.1016/j.jclepro.2024.141219

References

1. Blihar D, Phuu P, Kotelnikova S, Johnson E. Bacteremic cholangitis due to *Raoultella planticola* complicating intrahepatic bile duct stricture 5 years post-laparoscopic cholecystectomy: a case report. J Med Case Rep. 2021 Apr 7;15(1):152. DOI: 10.1186/s13256-021-02762-0
2. Sękowska A. The many faces of *Raoultella* spp. Advances in Hygiene and Experimental Medicine. 2019;73:713-720. DOI: 10.5604/01.3001.0013.6377
3. Hajjar R, Ambaraghassi G, Sebahang H, Schwenter F, Su SH. *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and Resistance. Infect Drug Resist. 2020 Apr 15;13:1091-1104. DOI: 10.2147/IDR.S191387
4. Taxonomy Browser [Electronic resource]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=160674> (accessed 13.05.2024).
5. Abd El-Ghany WA. A spotlight on *Raoultella ornithinolytica*: a newly emerging life-threatening zoonotic pathogen. Int J of One Health. 2021;7(1):1-6. DOI: 10.14202/IJOH.2021.1-5
6. Delik E, Eroğlu B, Tefon-Öztürk BE. Evaluation of the in vitro effects of concentrations of antibiotics on three Enterobacteriaceae isolates. World J Microbiol Biotechnol. 2024 Jan 19;40(2):73. DOI: 10.1007/s11274-023-03877-w
7. Ma Y, Wu X, Li S, Tang L, Chen M, An Q. Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. Res Microbiol. 2021 Sep-Oct;172(6):103851. DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103851
8. Dolganova SG, Nohrina EV. Sanitary-microbiological assessment of freshwater fish. Vestnik IrGSHA. 2019;90:131-139. (In Russian).
9. Zagaynova AV, Yudin SM, Abramov IA, Nedachin AE, Aslanova MM, Lukashina MV, et al. Definition of the list of potentially pathogenic and pathogenic microorganisms of bacterial, viral and parasitic nature circulating in waste and surface waters. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2021;2:50-63. DOI: 10.33092/0025-8326mp2021.2.50-63 (In Russian).
10. Zagaynova AV, Aslanova MM, Kurbatova IV, Rakova VM, Fedez ZE, Pay GV, et al. Optimization of methods for sanitary-microbiological and sanitary-parasitological control of wastewater. Hygiene and Sanitation. 2022;101(5):545-555. DOI: 10.47470/0016-9900-2022-101-5-545-555 (In Russian).
11. Puljko A, Babić I, Rozman SD, Barišić I, Jelić M, Maravić A, et al. Treated municipal wastewater as a source of high-risk and emerging multidrug-resistant clones of *E. coli* and other Enterobacterales producing extended-spectrum β -lactamases. Environ Res. 2024 Feb 15;243:117792. DOI: 10.1016/j.envres.2023.117792
12. Burlak VA, Fedorova VS, Kirilenko KM, Vorob'ev RS, Kokhanenko AA, Artemov GN. Микробиом кисеичника комаров-переносчиков диофиларии. Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тезисы докладов Второго Всероссийского научного конгресса с международным участием. Иркутск, 28 февраля 2022 года. Иркутск: Иркутский государственный университет, 2022;123-126. (In Russian).
13. Qu T, Wang P, Zhao X, Liang L, Ge Y, Chen Y. Metagenomics reveals differences in the composition of bacterial antimicrobial resistance and antibiotic resistance genes in pasteurized yogurt and probiotic bacteria yogurt from China. J Dairy Sci. 2024 Jun;107(6):3451-3467. DOI: 10.3168/jds.2023-23983
14. Mori M, Ohta M, Agata N, Kido N, Arakawa Y, Ito H, et al. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. Microbiol Immunol. 1989;33(11):887-95. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1989.tb00976.x
15. Westbrook GL, O'Hara CM, Roman SB, Miller JM. Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. J Clin Microbiol. 2000 Apr;38(4):1495-7. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1495-1497.2000
16. Sękowska A. *Raoultella* spp. – clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. Folia Microbiol (Praha). 2017 May;62(3):221-227. DOI: 10.1007/s12223-016-0490-7
17. Chezhganova EA, Efimova OS, Sozinov SA, Efimova AR, Sakharova VM, Kutikhin AG, et al. Particulate Matter in a Hospital Environment: as Potential Reservoir for Hospital Strains. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2019;18(4):82-92. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-82-92 (In Russian).
18. Chezhganova EA, Medvedeva NV, Sakharova VM, Brusina EB. Epidemic process of respiratory infections and particulate matter as a route for transmission of multidrug-resistant microorganisms in medical organisations. Fundamental and Clinical Medicine. 2020;6(1):47-52. DOI: 10.23946/2500-0764-2020-5-1-47-52 (In Russian).
19. Podschun R, Fischer A, Ullman U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. J Med Microbiol. 2000 Feb;49(2):115-119. DOI: 10.1099/0022-1317-49-2-115
20. Al-Hulu SM, Al-Charrakh AH, Al-Saadi MAK. Isolation and characterization of *Raoultella ornithinolytica* from clinical specimens in Hilla city. Iraq. Med J Babylon. 2009;7(4):42-47.
21. Appel TM, Quijano-Martínez N, De La Cadena E, Mojica MF, Villegas MV. Microbiological and Clinical Aspects of *Raoultella* spp. Front Public Health. 2021 Aug 2;9:686789. DOI: 10.3389/fpubh.2021.686789
22. Yu VC, Yu PH, Ho KC, Lee FW. Isolation and identification of a new tetrodotoxin-producing bacterial species, *Raoultella terrigena*, from Hong Kong marine puffer fish *Takifugu niphobles*. Mar Drugs. 2011;9(11):2384-2396. DOI: 10.3390/md9112384
23. Salimiyan rizi K, Farsiani H. *Raoultella* Infections from Clinical to Laboratory – Update & Literature review. Reviews in Clinical Medicine. 2022;9(4):159-171. DOI: 10.22038/rcm.2023.68403.1416
24. Wang M, Fan Y, Liu P, Liu Y, Zhang J, Jiang Y. Genomic insights into evolution of pathogenicity and resistance of multidrug-resistant *Raoultella ornithinolytica* WM1. Ann N Y Acad Sci. 2021 Aug;1497(1):74-90. DOI: 10.1111/nyas.14595
25. Wu Z, Gou R, Sha L, Yu C, Meng L, Jin Z. Effects of Luteolin-7-O-Glucoside on Intestinal Microbiota Dysbiosis and Drug Resistance Transmission Caused by *Raoultella ornithinolytica* B1645-1: Modulating the Composition of Intestinal Microbiota and Promoting the Transfer of blaNDM-1 Gene from Genus *Enterococcus* to *Lactobacillus* in Mice. Microorganisms. 2023 Oct 2;11(10):2477. DOI: 10.3390/microorganisms11102477
26. Zou H, Berglund B, Xu H, Chi X, Zhao Q, Zhou Z, Xia H, Li X, Zheng B. Genetic characterization and virulence of a carbapenem-resistant *Raoultella ornithinolytica* isolated from well water carrying a novel megaplasmid containing blaNDM-1. Environ Pollut. 2020 May;260:114041. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114041
27. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EYu, Ivanchik NV, Shajdullina ER, Mikotina AV, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2019;21(2):147-159. DOI: 10.36488/cmac.2019.2.147-159 (In Russian).
28. Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY. Low virulence? Clinical characteristics of *Raoultella planticola* bacteremia. Infection. 2014 Oct;42(5):899-904. DOI: 10.1007/s15010-014-0664-7
29. Seng P, Boushab BM, Romain F, Gouriet F, Bruder N, Martin C, et al. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. Int J Infect Dis. 2016 Apr;45:65-71. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.02.014
30. Sękowska A, Dylewska K, Gospodarek E, Bogiel T. Catheter-related blood stream infection caused by *Raoultella ornithinolytica*. Folia Microbiol (Praha). 2015 Nov;60(6):493-5. DOI: 10.1007/s12223-015-0390-2
31. Chen X, Zhou X, Cao J, Ma K, Xia Z. A case report of community-acquired *Raoultella ornithinolytica* infection in a healthy, young individual. BMC Infect Dis. 2021 Oct 24;21(1):1095. DOI: 10.1186/s12879-021-06799-w

32. Hong KW, Cheon YH, Moon K, Hong SI, Ryu BH, Cho OH, et al. Comparison of the clinical characteristics and outcomes of bloodstream infections caused by *Raoultella* species and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis (Lond)*. 2020 Jul;52(7):489-497. DOI: 10.1080/23744235.2020.1758764
33. Cavaliere M, Bartoletti G, Capriglione P, Di Lullo AM, Motta G, Iengo M, et al. Unusual Localization of an Emergent Bacterium, *Raoultella ornithinolytica*. *Case Rep Med*. 2020 Mar 30;2020:1710271. DOI: 10.1155/2020/1710271
34. Baek J, Park MJ, Lee HY, Kang S. *Raoultella Ornithinolytica* in a Healthy, Young Person: Rapidly Progressive Sinusitis with Orbital and Intracranial Involvement. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2023 Sep 18;10(10):003987. DOI: 10.12890/2023_003987
35. Zaynullina ON, Pechkurov DV, Lyamin AV, Khismatullina ZR. Treatment of intestinal dysbiosis as a part of comprehensive therapy for atopic dermatitis in children. *Vopr. prakt. pediatri*. (Clinical Practice in Pediatrics). 2019;14(2):81-86. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-2-81-86 (In Russian).
36. Zaynullina ON, Pechkurov DV, Lyamin AV, Khismatullina ZR. Characterization of the main biotopes microbiome in children with atopic dermatitis. *Pediatria n.a. G.N.Speransky*. 2020;99(2):74-80. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-2-74-80 (In Russian).
37. Zhestkov AV, Lyamin AV, Pobezhimova OO. Evaluation of the culturoma of the discharge of the upper respiratory tract and the contents of the colon in patients with atopic dermatitis. *The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*. 2022;15(1):17-25. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).17-25 (In Russian).
38. Kaganova MA, Spiridonova NV, Kazakova AV, Devyatova OO, Galkina DA, Golovina ON. Features of the cervical canal microbiota in prenatal amniorrhea and full-term pregnancy. *Akusherstvo i Ginekologiya / Obstetrics and Gynecology*. 2019;5:77-84. DOI: 10.18565/aig.2019.5.77-84 (In Russian).
39. Perepelitsa SA. Mikrobiologicheskii monitoring materi i rebenka v blizhaishem poslerodovom periode. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;23(S1):32-33. (In Russian).
40. Shmylenko VA, Bondarenko AP, Trotsenko OE, Pshenichnaya NYu, Gromova TV. Bacterial microbiota of respiratory tract isolated during initial and follow-up examination of patients suffering from community acquired pneumonia during covid-19 pandemic (december 2020 – march 2021) in the Khabarovsk city. *Problems in Medical Mycology*. 2021;23(2):165. (In Russian).
41. Trotsenko OE, Bondarenko AP, Shmylenko VA, Bazykina EA, Pshenichnaya NYu, Zaitseva TA, et al. Characteristics of respiratory tract bacterial microflora detected in patients suffering from community-acquired pneumonia during continuing spread of the new coronavirus infection in Khabarovsk city (december 2020 – march 2021). *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*. 2022;12(4):713-725. DOI: 10.15789/2220-7619-COR-1839 (In Russian).
42. Eremenko YuE, Talankina AS, Titov LP, Sidelova SI, Shestakova EV, Nosova ES. Chronic rhinosinusitis: microbial landscape and biofilm forming ability. *Otorhinolaryngology. Eastern Europe*. 2019;9(4):427-435. (In Russian).
43. Auezov AS, Chingisova LT, Rakisheva AS, Bismilda VL, Nurbaeva KZh, Shamurova ZM. Nature of non-specific microflora in patients with tuberculosis. *Phthisiopulmonology*. 2021;2:32-36. (In Russian).
44. Krasovskiy SA, Amelina EL, Kondrat'eva EI, Shaginyan IA, Chernukha MYu, Chernyak AV, et al. Lower respiratory infection in patients with cystic fibrosis in Russian Federation according to the National Register, 2014. *Pulmonologiya*. 2016;26(4):421-435. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-421-435 (In Russian).
45. Baranov AA, Namazova-Baranova LS, Kutsev SI, Avdeev SN, Polevichenko EV, Belevskiy AS, et al. Modern Approaches in Management of Children with Cystic fibrosis. *Pediatric pharmacology*. 2022;19(2):153-195. DOI: 10.15690/pf.v19i2.2417 (In Russian).
46. Ketsko YuL, Petrovskaya EV, Lyamin AV. The effectiveness of the use of antibiotic treatment of different groups of the severity of patients with viral and bacterial pneumonia in the post-pandemic period and the pandemic year 2009/2011. *Tol'yattinskii meditsinskii konsilium*. 2015;3-4:25-29. (In Russian).
47. Shabunin AV, Tavobilov MM. Selection of decompression bile ducts in the treatment of patients with obstructive jaundice of tumor genesis. *I.P.Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2016;24(1):68-74. (In Russian).
48. Tretyakova NA, Sukhanin VS, Vdovushkina TA. Spondylitis as a complication of urosepsis and infective endocarditis (case report). *RMJ*. 2020;28(8):37-40. (In Russian).
49. Volynchik EP, Bolshakov LV, Balakirev EM, Bogomolova NS. The prophylaxis and treatment to infectious complications caused by nosoco-mial flora after kidney transplantation from living related donor. *Transplantologiya*. 2011;(2-3):63-68. DOI: 10.23873/2074-0506-2011-0-2-3-63-68 (In Russian).
50. Volynchik EP, Bolshakov LV, Bogomolova NS, Balakirev EM. Complications in the immediate and early postoperative period following kidney transplantation from related donor. *Transplantologiya*. 2013;1:18-24. (In Russian).
51. Korobova AG, Klyasova GA, Okhmat VA, Kravchenko SK, Parovichnikova EN, Savchenko VG. Intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae in patients with acute myeloid leukaemia and lymphoma. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2017;62(3):116-123. DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-3-116-123 (In Russian).
52. Bhatt P, Tandel K, Das NK, Rathi KR. New Delhi metallo- β -lactamase producing extensively drug-resistant *Raoultella ornithinolytica* isolated from drain fluid following Whipple's pancreaticoduodenectomy. *Med J Armed Forces India*. 2015 Dec;71(Suppl 2):S609-11. DOI: 10.1016/j.mjafi.2015.01.005
53. Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY. Clinical characteristics of *Raoultella ornithinolytica* bacteremia. *Infection*. 2015 Feb;43(1):59-64. DOI: 10.1007/s15010-014-0696-z
54. Doherty G, Kreinices J, Souza F, Kim DE. Chronic cholecystitis from *Raoultella planticola* infection associated with adenomyomatous hyperplasia. *J Surg Case Rep*. 2022 Nov 28;2022(11):rjac529. DOI: 10.1093/jscr/rjac529
55. Hajjar R, Schwenter F, Su SH, Gasse MC, Sebahang H. Community-acquired infection to *Raoultella ornithinolytica* presenting as appendicitis and shock in a healthy individual. *J Surg Case Rep*. 2018 May 15;2018(5):rjy097. DOI: 10.1093/jscr/rjy097
56. Bondarenko AP, Bydatsirenova LV, Ignatyeva ME, Shmylenko VA, Trotsenko OE, Dyatlov IA. Clustered cases of polyetiological bacterial food poisoning caused by consumption of fish preserves in the Republic Sakha (Yakutia) in august of year 2018. *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2020;39(39):85-92. (In Russian).
57. Kataeva LV, Stepanova TF, Rebeshchenko AP, Posoyuznykh OV, Khu TKhD, Le TMKh. Sravnitel'naya kharakteristika mikrobiotsenoza slizistyk zeva i pryamoi kishki patsientov Natsional'nogo gospiytalya pediatrii g. Kanoi, SRV. *Infektsiya i immunitet*. 2017;S:932. (In Russian).
58. Kalogeropoulos D, Asproudis C, Priavali E, Pappa C, Kalogeropoulos C, Asproudis I. A novel case of *Raoultella planticola* – associated acute dacryocystitis. *Orbit*. 2024 Feb;43(1):157-159. DOI: 10.1080/01676830.2022.2089168
59. Salih LIF, Rasheed RO, Muhammed SM. *Raoultella ornithinolytica* as a Potential Candidate for Bioremediation of Heavy Metal from Contaminated Environments. *J Microbiol Biotechnol*. 2023 Jul 28;33(7):895-908. DOI: 10.4014/jmb.2212.12045
60. Ghosh S, Sarkar B, Thongmee S. Bacteria mediated cadmium removal for wastewater treatment. *Development in Wastewater Treatment Research and Processes. Elsevier*, 2024:137-156. DOI: 10.1016/B978-0-323-99278-7.00001-8
61. Li C, Xing J, Xu Q, Cui D, Liu Y, Pang C, Li A. Biochar and microorganism assisted phytoremediation of severely molybdenum-contaminated soil: Efficacy, mechanisms and the impact of low temperatures. *J of Cleaner Production*. 2024;444:141219. DOI: 10.1016/j.jclepro.2024.141219

Информация о соавторе:

Кравченко Анастасия Сергеевна, студент ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России

Information about co-author:

Anastasia S. Kravchenko, student of Kemerovo State Medical University

Геномы штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от пациентов с инвазивными формами листериоза и из пищевых продуктов

М.В.Фурсов¹, А.Е.Соломенцева¹, Л.А.Шишкина¹, К.В.Детушев¹, Т.Н.Мухина¹, А.И.Козлов¹,
Н.А.Сухаричева¹, А.А.Кисличкина¹, Е.А.Алексеева^{1,2}, Н.К.Фурсова¹

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

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области» Роспотребнадзора, Вологда, Российская Федерация

В исследовании проведено полногеномное секвенирование 217 штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных с 2010 по 2024 г. в 14 регионах Российской Федерации от больных людей, пищевых продуктов и окружающей среды. Полученные геномные данные направлены на совершенствование эпидемиологического надзора и профилактики листериоза, а последующий анализ генетических линий, факторов вирулентности и устойчивости к антибиотикам позволит оптимизировать стратегии контроля заболевания.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, полногеномное секвенирование

Для цитирования: Фурсов М.В., Соломенцева А.Е., Шишкина Л.А., Детушев К.В., Мухина Т.Н., Козлов А.И., Сухаричева Н.А., Кисличкина А.А., Алексеева Е.А., Фурсова Н.К. Геномы штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от пациентов с инвазивными формами листериоза и из пищевых продуктов. Бактериология. 2025; 10(1): 112–115. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-112-115

Genomes of *Listeria monocytogenes* strains isolated from patients with invasive listeriosis and from foods

M.V.Fursov¹, A.E.Solomentseva¹, L.A.Shishkina¹, K.V.Detushev¹, T.N.Mukhina¹, A.I.Kozlov¹,
N.A.Suharicheva¹, A.A.Kislichkina¹, E.A.Alekseeva^{1,2}, N.K.Fursova¹

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

²The Center for Hygiene and Epidemiology in the Vologda Region, Rospotrebnadzor, Vologda, Russia

The study performed whole-genome sequencing of 217 *Listeria monocytogenes* strains isolated from sick people, food, and the environment across 14 Russian regions between 2010 and 2024. The genomic data aim to improve epidemiological surveillance and prevention of listeriosis, while further analysis of genetic lineages, virulence factors, and antibiotic resistance will help refine disease control strategies.

Key words: *Listeria monocytogenes*, whole genome sequencing

For citation: Fursov M.V., Solomentseva A.E., Shishkina L.A., Detushev K.V., Mukhina T.N., Kozlov A.I., Suharicheva N.A., Kislichkina A.A., Alekseeva E.A., Fursova N.K. Genomes of *Listeria monocytogenes* strains isolated from patients with invasive listeriosis and from foods. Bacteriology. 2025; 10(1): 112–115. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-112-115

Возбудитель листериоза *Listeria monocytogenes* – энтероинвазивная грамположительная факультативная анаэробная бактерия, внутриклеточный патоген, вызывающий инвазивные заболевания у человека и более чем у 40 видов животных [1]. Клетки *L. monocytogenes* могут про-

никать через кишечный, плацентарный и гематоэнцефалический барьеры, приводя к гастроэнтериту, внутриутробным инфекциям и менингоэнцефалиту, при этом общий уровень летальности у людей составляет от 20 до 30%. Заболеваемость листериозом человека колеблется от 0,1 до 11,3 слу-

Для корреспонденции:

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 06.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: fursov@obolensk.org

The article was received 06.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

чая на 1 млн населения в год, в зависимости от географического региона [2]. Заболеваемость листериозом связана с обсемененностью продуктов питания, включая как нативное сырье (мясо птицы, говядина, свинина, рыба), так и готовые к употреблению продукты (пельмени, долма, салаты и др.) [3]. Несмотря на то, что все штаммы *L. monocytogenes* являются потенциальными патогенами, различные генетические

линии вносят разный вклад в возникающие вспышки: >95% случаев листериоза у людей связано с 3 из 13 сероваров (серовары 1/2b и 4b из линии I и серовар 1/2a из линии II) [4]. Современные данные по геномной эпидемиологии листериоза, показавшие дифференциальную вирулентность разных генотипов/клональных комплексов *L. monocytogenes*, могут помочь прояснить дискуссию и нацелить применение крите-

Таблица. Геномы штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из разных источников на территории Российской Федерации в 2010–2024 гг.

Table. Genomes of *L. monocytogenes* strains isolated from different sources in the Russian Federation in 2010–2024

Источник / Source	Регионы / Regions	Годы / Years	Код доступа генома в базе данных GenBank / Genome access code in GenBank database	Размер генома, п.о. / Genome size, bp	Кол-во контигов / Number of contigs	Кол-во генов / Number of genes
Человек / Human	ВОО, КУО, ЛИО, РУД, САО, СХО, ТАО, ЯРО	2015-2023	SAMN41078365, SAMN41078366, SAMN41078367, SAMN41078368, SAMN41078378, SAMN41078385, SAMN41078387, SAMN41078388, SAMN41078389, SAMN41078390, SAMN41078391, SAMN41078392, SAMN41078393, SAMN41078394, SAMN41078431, SAMN41078486, SAMN41078494, SAMN41078495, SAMN41078496, SAMN41078497, SAMN41078503, SAMN41078515, SAMN41078521, SAMN41078522, SAMN41078523, SAMN41078524, SAMN41078525, SAMN41078526, SAMN41078527, SAMN41078528, SAMN41078529, SAMN41078530, SAMN41078531, SAMN41078532, SAMN41078533, SAMN41078534, SAMN41078535.	2876632-3023094	36-97	2913-3083
Пищевые продукты / Food	ВОО, КАО, МОО, НОО, РУД, СХО, ТВО, ТУО, ЯРО	2013-2024	SAMN41078373, SAMN41078407, SAMN41078408, SAMN41078409, SAMN41078410, SAMN41078411, SAMN41078412, SAMN41078413, SAMN41078414, SAMN41078415, SAMN41078416, SAMN41078418, SAMN41078419, SAMN41078420, SAMN41078421, SAMN41078422, SAMN41078423, SAMN41078432, SAMN41078433, SAMN41078434, SAMN41078435, SAMN41078436, SAMN41078437, SAMN41078438, SAMN41078439, SAMN41078440, SAMN41078441, SAMN41078442, SAMN41078443, SAMN41078444, SAMN41078445, SAMN41078446, SAMN41078447, SAMN41078448, SAMN41078449, SAMN41078450, SAMN41078451, SAMN41078452, SAMN41078453, SAMN41078454, SAMN41078455, SAMN41078456, SAMN41078457, SAMN41078458, SAMN41078459, SAMN41078460, SAMN41078461, SAMN41078462, SAMN41078463, SAMN41078464, SAMN41078465, SAMN41078466, SAMN41078467, SAMN41078468, SAMN41078469, SAMN41078470, SAMN41078471, SAMN41078472, SAMN41078473, SAMN41078474, SAMN41078475, SAMN41078476, SAMN41078477, SAMN41078478, SAMN41078479, SAMN41078480, SAMN41078481, SAMN41078482, SAMN41078483, SAMN41078484, SAMN41078485, SAMN41078487, SAMN41078488, SAMN41078489, SAMN41078490, SAMN41078491, SAMN41078492, SAMN41078493, SAMN41078498, SAMN41078499, SAMN41078500, SAMN41078501, SAMN41078502, SAMN41078536, SAMN41078537, SAMN41078538, SAMN41078539, SAMN41078540, SAMN41078541, SAMN41078542, SAMN41078543, SAMN41078544, SAMN41078545, SAMN41078546, SAMN41078547, SAMN41078548, SAMN41078549, SAMN41078358, SAMN41078359, SAMN41078360, SAMN41078429, SAMN41078504, SAMN41078505, SAMN41078506, SAMN41078507, SAMN41078508, SAMN41078374, SAMN41078364, SAMN41078369, SAMN41078370, SAMN41078371, SAMN41078372, SAMN41078509, SAMN41078379, SAMN41078380, SAMN41078381, SAMN41078382, SAMN41078383, SAMN41078384, SAMN41078386, SAMN41078395, SAMN41078397, SAMN41078398, SAMN41078399, SAMN41078400, SAMN41078401, SAMN41078402, SAMN41078403, SAMN41078404, SAMN41078405, SAMN41078406, SAMN41078424, SAMN41078425, SAMN41078426, SAMN41078427, SAMN41078428, SAMN41078516, SAMN41078517, SAMN41078518, SAMN41078519, SAMN41078520.	2991455-3092737	20-100	2723-3062
Окружающая среда / Environment	ВОО, ЛИО, МОО, САО, ЯРО	2010-2021	SAMN41078353, SAMN41078354, SAMN41078355, SAMN41078356, SAMN41078357, SAMN41078361, SAMN41078362, SAMN41078363, SAMN41078375, SAMN41078376, SAMN41078377, SAMN41078417, SAMN41078511, SAMN41078512, SAMN41078513, SAMN41078514, SAMN41078430, SAMN41078510, SAMN41078511, SAMN41078512, SAMN41078513, SAMN41078514.	2848517-3114330	20-97	2754-3017

ВОО – Вологодская область; КАО – Калужская область; КУО – Курская область; ЛИО – Липецкая область; МОО – Московская область; НОО – Новгородская область; РУД – Республика Удмуртия; САО – Саратовская область; СХО – Сахалинская область; ТАО – Тамбовская область; ТВО – Тверская область; ТУО – Тульская область; ЯРО – Ярославская область. / ВОО – Vologda Oblast; КАО – Kaluga Oblast; КУО – Kursk Oblast; ЛИО – Lipetsk Oblast; МОО – Moscow Oblast; НОО – Novgorod Oblast; РУД – Udmurt Republic; САО – Saratov Oblast; СХО – Sakhalin Oblast; ТАО – Tambov Oblast; ТВО – Tver Oblast; ТУО – Tula Oblast; ЯРО – Yaroslavl Oblast.

риев нулевой толерантности к тем генотипам, которые с наибольшей вероятностью могут вызвать инвазивный листериоз [5, 6].

Целью данной работы было полногеномное секвенирование штаммов *L. monocytogenes* ($n = 217$), выделенных в 2010–2024 гг. в 14 субъектах Российской Федерации (Вологодской обл. $n = 130$; Ярославская обл. $n = 23$; Московская обл. $n = 15$; Липецкая обл. $n = 12$; Сахалинская обл. $n = 8$; Саратовская обл. $n = 6$; Республика Удмуртия $n = 6$; Курская обл. $n = 5$; Калужская обл. $n = 3$; Тверская обл. $n = 3$; Новгородская обл. $n = 2$; Тамбовская обл. $n = 2$; Республика Саха $n = 1$; Тульская обл. $n = 1$), в т.ч. от пациентов с инвазивным листериозом ($n = 40$), из пищевых продуктов ($n = 156$) и из окружающей среды ($n = 21$).

ДНК выделяли с использованием набора DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Хильден, Германия). Полногеномное секвенирование проводили на следующих платформах: Illumina MiSeq, с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina, Карлсбад, США) и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, Карлсбад, США); DNBSEQ-G400 (MGISEQ-2000), с использованием предварительной фрагментации молекул ДНК в системе BioRuptor (Diagenode, Милуоки, США) и наборов MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (Wuhan MGI Tech Co., Ltd, Ухань, Китай) и MGISEQ-2000 PE150 High-throughput Sequencing Set (Wuhan MGI Tech Co., Ltd, Ухань, Китай); GenoLab M, с использованием наборов SG GM Plus («Сесана», Москва, Россия) и GenoLab M Sequencing set V 2.0 (GeneMind Biosciences Co., Ltd., Шэньчжэнь, Китай). Полученные единичные прочтения собирали в контиги с использованием программы Unicycler 0.5.0 (<https://github.com/rwrick/Unicycler>). Собранные de novo геномы аннотировали в базу данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (таблица).

Подробный анализ принадлежности штаммов к генетическим линиям *L. monocytogenes*, наличия в геномах генетических детерминант факторов вирулентности и устойчивости к антимикробным препаратам, а также филогенетический анализ будут представлены в последующих работах. Полученные данные могут быть использованы для совершенствования эпидемиологического надзора за листериозной инфекцией, организации и проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий в Российской Федерации.

Информация об исследованиях, где в качестве объектов выступали люди

В соответствии с требованиями Биоэтического комитета Российской Федерации в работе использованы клинические штаммы *L. monocytogenes* без указания персональных данных пациентов, таких как имя, дата рождения, адрес, история болезни и др.

Информация о финансировании

Секвенирование штаммов *L. monocytogenes* выполнено в рамках: федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» соглашение №141-02-2023-290 (100 штаммов), гранта Минобрнауки (соглашение №075-15-2019-1671) (96 штаммов) и отраслевой программы Роспотребнадзора (5 штаммов).

Financial support

Sequencing of *L. monocytogenes* strains was carried out within the framework of: the federal project “Sanitary Shield – health safety (prevention, detection, response)” agreement No 141-02-2023-290 (100 strains), a grant from the Ministry of Education and Science (agreement No 075-15-2019-1671) (96 strains) and the industry program of Rosпотребнадзор (5 strains).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Quereda JJ, Morón-García A, Palacios-Gorba C, Dessaux C, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG, et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):2509–2545. DOI: 10.1080/21505594.2021.1975526
2. Koopmans MM, Brouwer MC, Vázquez-Boland JA, van de Beek D. Human *Listeriosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2023 Mar 23;36(1):e0006019. DOI: 10.1128/cmr.00060-19
3. Груздева ОА, Тартаковский ИС, Малеев ВВ, Салтагареев РШ, Кормилицина ВГ, Шарапенченко СО, и др. *Listeria monocytogenes* сегодня. Российский медицинский журнал. 2021;27(5):491–500. DOI: 10.17816/0869-2106-2021-27-5-491-500
4. Chenal-Francisque V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, et al. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun;17(6):1110–2. DOI: 10.3201/eid1706.101778
5. Bergholz TM, Shah MK, Burall LS, Rakic-Martinez M, Datta AR. Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Apr;102(8):3475–3485. DOI: 10.1007/s00253-018-8852-5
6. Асташкин ЕИ, Алексеева ЕА, Борзенков ВН, Кисличкина АА, Мухина ТН, Платонов МЕ, и др. Молекулярно-генетическая характеристика полирезистентных штаммов *Listeria monocytogenes* и идентификация новых сиквенс-типов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2021;39(4):3–13. DOI: 10.17116/molgen2021390413

References

1. Quereda JJ, Morón-García A, Palacios-Gorba C, Dessaux C, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG, et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):2509–2545. DOI: 10.1080/21505594.2021.1975526
2. Koopmans MM, Brouwer MC, Vázquez-Boland JA, van de Beek D. Human *Listeriosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2023 Mar 23;36(1):e0006019. DOI: 10.1128/cmr.00060-19
3. Gruzdeva OA, Tartakovsky IS, Maleev VV, Saitgareev RSh, Kormilitsina VG, Sharapchenko SO, et al. *Listeria monocytogenes* today. *Russian Medicine*. 2021;27(5):491–500. DOI: 10.17816/0869-2106-2021-27-5-491-500 (In Russian).
4. Chenal-Francisque V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, et al. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun;17(6):1110–2. DOI: 10.3201/eid1706.101778
5. Bergholz TM, Shah MK, Burall LS, Rakic-Martinez M, Datta AR. Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Apr;102(8):3475–3485. DOI: 10.1007/s00253-018-8852-5
6. Astashkin EI, Alekseeva EA, Borzenkov VN, Kislichkina AA, Mukhina TN, Platonov ME, et al. Molecular-Genetic Characteristics of Polyresistant *Listeria monocytogenes* Strains and Identification of New Sequence Types. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2021;39(4):3–13. DOI: 10.17116/molgen2021390413 (In Russian).

Информация о соавторах:

Соломенцева Александра Евгеньевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шишкина Лидия Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Козлов Алексей Игоревич, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сухаричева Наталья Алексеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Алексеева Елена Андреевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела информационных технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, заведующая отделом лабораторных исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

Alexandra E. Solomentseva, Junior Researcher, Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Lidia A. Shishkina, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Konstantin V. Detushev, Junior Researcher, Collection Cultures Department, Federal State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Tatyana N. Mukhina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Aleksey I. Kozlov, Junior Researcher, Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalya A. Sukharicheva, PhD in Biological Sciences, Junior Researcher, Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

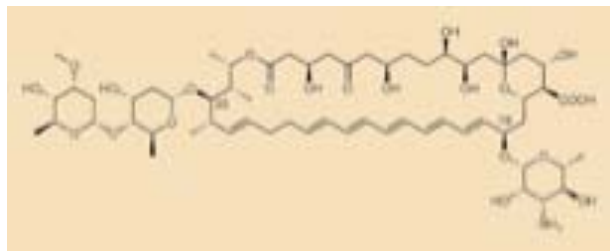
Angelina A. Kislichkina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elena A. Alekseeva, MD, PhD, Senior Researcher, Information Technology Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Head of the Laboratory Research Department, Center for Hygiene and Epidemiology in the Vologda Region

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, of Molecular Microbiology Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ**Новое природное соединение против резистентных грибов**

Сообщается об открытии полиенового противогрибкового антибиотика мандимицина с использованием платформы обнаружения природных продуктов, ориентированной на филогению. Мандимицин синтезируется кластером генов *mand*, эволюционировал отличным от известных полиеновых макролидных антибиотиков образом и модифицирован тремя дезоксисахарами. Вещество демонстрирует мощную и широкую гамма-цидную активность против широкого спектра грибковых патогенов с множественной лекарственной устойчивостью как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Мандимицин обладает уникальным механизмом действия, нацеленным на различные фосфолипиды в клеточных мембранах грибов, что приводит к высвобождению необходимых ионов из клеток грибов. Эта уникальная способность связывать несколько мишеней придает ему надежную фунгицидную активность, а также способность избегать резистентности. Идентификация мандимицина с использованием стратегии обнаружения природных продуктов, направленной на филогению, представляет собой важный шаг вперед в раскрытии антимикробных соединений с различными механизмами действия, которые могут быть разработаны для борьбы с грибковыми патогенами с множественной лекарственной устойчивостью.



Deng Q, Li Y, He W, Chen T, Liu N, Ma L, et al.
A polyene macrolide targeting phospholipids in the fungal cell membrane.
Nature. 2025 Mar 19. DOI: 10.1038/s41586-025-08678-9

Геномные последовательности изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии в 2024 году

Л.В.Колупаева¹, Н.В.Колупаева¹, А.Ю.Лебедева¹, В.И.Соломенцев¹, А.А.Сизова¹, М.В.Фурсов¹,
Е.Б.Лазарева², Т.В.Черненькая², А.В.Попова¹, Н.В.Воложанцев¹

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

²ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Российская Федерация

Acinetobacter baumannii и *Klebsiella pneumoniae* являются значимыми возбудителями внутрибольничных инфекций во всем мире. В данной работе проведено полногеномное секвенирование изолятов, выделенных из крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии многопрофильного научно-практического центра экстренной медицинской помощи в период с января по сентябрь 2024 г.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, полногеномное секвенирование

Для цитирования: Колупаева Л.В., Колупаева Н.В., Лебедева А.Ю., Соломенцев В.И., Сизова А.А., Фурсов М.В., Лазарева Е.Б., Черненькая Т.В., Попова А.В., Воложанцев Н.В. Геномные последовательности изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии в 2024 году. Бактериология. 2025; 10(1): 116–118. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-116-118

Genomic sequences of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from the blood of patients of intensive care unit in 2024

L.V.Kolupaeva¹, N.V.Kolupaeva¹, A.Yu.Lebedeva¹, V.I.Solomentsev¹, A.A.Sizova¹, M.V.Fursov¹,
E.B.Lazareva², T.V.Chernenkaya², A.V.Popova¹, N.V.Volozhantsev¹

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

²Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation

Acinetobacter baumannii and *Klebsiella pneumoniae* are significant nosocomial pathogens all over the world. In this work, whole-genome sequencing of these pathogens, isolated from the blood of patients of the intensive care unit of the multidisciplinary scientific and practical center of emergency medicine from January to September 2024, was performed.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, полногеномное секвенирование

For citation: Kolupaeva L.V., Kolupaeva N.V., Lebedeva A.Yu., Solomentsev V.I., Sizova A.A., Fursov M.V., Lazareva E.B., Chernenkaya T.V., Popova A.V., Volozhantsev N.V. Genomic sequences of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from the blood of patients of intensive care unit in 2024. Bacteriology. 2025; 10(1): 116–118. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-116-118

Для корреспонденции:

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: nikvol@obolensk.org

Статья поступила 06.03.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Nikolay V. Volozhantsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0147
E-mail: nikvol@obolensk.org

The article was received 06.03.2024, accepted for publication 31.03.2025

Многочисленные исследования в разных странах мира свидетельствуют о том, что инфекции у госпитализированных пациентов, приобретенные во время пребывания в стационаре (внутрибольничные, или нозокомиальные инфекции), являются наиболее частым осложнением, а также главной причиной удлинения сроков госпитализации и летальности. *Acinetobacter baumannii*, представитель неферментирующих грамотрицательных аэробных бактерий, и *Klebsiella pneumoniae*, грамотрицательная бактерия семейства *Enterobacteriaceae*, являются одними из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций [1, 2], отнесенных в 2024 г. Всемирной организацией здравоохранения к группе бактерий первой категории приоритетности для проведения исследований и разработки новых стратегий антибактериальной терапии [3]. На сегодняшний день госпитальные инфекции, вызываемые *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, пред-

ставляют собой серьезную проблему для лечения в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), плановой и экстренной хирургии, ожоговых отделениях, особенно в случае иммунокомпрометированных больных. Инфекционные осложнения, вызываемые *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, включают вентилятор-ассоциированную пневмонию, инфекции кожи и мягких тканей, раневые инфекции, катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей и перитониты на фоне перитонеального диализа, вторичные менингиты при нейрохирургических вмешательствах и травмах головы, эндокардиты, абсцессы мозга и легких, эмпиемы плевры, медиастениты, инфекции кровотока [1, 2, 4].

Целью данной работы было полногеномное секвенирование изолятов *A. baumannii* ($n = 15$) и *K. pneumoniae* ($n = 52$), выделенных из крови пациентов ОРИТ в период с января по сентябрь 2024 г.

Таблица. Данные секвенирования геномов изолятов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*
 Table. Genome sequencing data for *A. baumannii* and *K. pneumoniae* isolates

Обозначение / Isolate designation	Номер доступа генома в базе данных GenBank / GenBank accession number	Количество контингов / Number of contigs	Инвентарный номер в ГКПМ- Оболенск* / Accession number in SCPM- Obolensk*
<i>A. baumannii</i>			
ABS4984	SAMN46259119	105	B-15821
ABS4062	SAMN46259120	105	B-15822
ANS7072	SAMN46259128	162	B-16457
ABS09493	SAMN46259122	146	B-16451
ABS09481	SAMN46259123	139	B-16452
ABS09593	SAMN46259126	146	B-16455
ABS78057	SAMN46259125	106	B-16454
ABS82612	SAMN46259121	148	B-16450
ABS82603	SAMN46259124	146	B-16453
ABS82146	SAMN46259127	149	B-16456
ABS30421	SAMN46259165	139	B-17190
ABS2640	SAMN46259166	120	B-17192
ABS7948	SAMN46259166	118	B-17191
ABS1720	SAMN46259169	118	B-17194
ABS8964	SAMN46259168	130	B-17193
<i>K. pneumoniae</i>			
KPS0683	SAMN46259116	166	B-15818
KPS0700	SAMN46259117	129	B-15819
KPS4326	SAMN46259118	147	B-15820
KPS9399	SAMN46259129	143	B-16458
KPS9821	SAMN46259103	138	B-15805
KPS4208	SAMN46259106	119	B-15808
KPS9827	SAMN46259105	122	B-15807
KPS6724	SAMN46259104	132	B-15806
KPS7051	SAMN46259146	102	B-16476
KPS6729	SAMN46259107	62	B-15809
KPS4983	SAMN46259108	62	B-15810
KPS3995	SAMN46259109	83	B-15811
KPS2933	SAMN46259110	116	B-15812
KPS7481	SAMN46259111	111	B-15813
KPS1210	SAMN46259114	128	B-15816

KPS7939	SAMN46259112	101	B-15814
KPS9733	SAMN46259113	118	B-15815
KPS8329	SAMN46259115	136	B-15817
KPS6974	SAMN46259142	180	B-16471
KPS6976	SAMN46259141	143	B-16470
KPS6483	SAMN46259148	156	B-16478
KPS09487	SAMN46259138	125	B-16467
KPS9086	SAMN46259149	122	B-16479
KPS1073	SAMN46259143	140	B-16472
KPS2936	SAMN46259145	129	B-16475
KPS3294	SAMN46259140	141	B-16469
KPS3178	SAMN46259144	114	B-16473
KPS3271	SAMN46259147	158	B-16477
KPS82148	SAMN46259131	114	B-16460
KPS47018	SAMN46259132	169	B-16461
KPS43107-1	SAMN46259136	117	B-16465
KPS46086	SAMN46259130	123	B-16459
KPS78055	SAMN46259133	144	B-16462
KPS09509	SAMN46259134	99	B-16463
KPS78054	SAMN46259139	166	B-16468
KPS78133	SAMN46259137	165	B-16466
KPS08810	SAMN46259135	114	B-16464
KPS20601	SAMN46259150	127	B-17173
KPS2894	SAMN46259151	158	B-17174
KPS8961	SAMN46259152	92	B-17175
KPS9940	SAMN46259153	124	B-17177
KPS9941	SAMN46259154	120	B-17179
KPS6123	SAMN46259156	81	B-17181
KPS10299	SAMN46259155	128	B-17180
KPS8949	SAMN46259157	119	B-17182
KPS7136	SAMN46259158	116	B-17183
KPS8914	SAMN46259159	142	B-17184
KPS8155	SAMN46259160	101	B-17185
KPS8500	SAMN46259161	134	B-17186
KPS6191	SAMN46259162	142	B-17187
KPS6186	SAMN46259163	123	B-17188
KPS4431	SAMN46259164	162	B-17189

*ГКПМ-Оболенск – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (Оболенск). / *SCPM-Obolensk – State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures (Obolensk).

Выделение ДНК осуществляли с использованием набора DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Хильден, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Полногеномное секвенирование проводили на платформе DNBSEQ-G400 (MGISEQ-2000) (BGI, Пекин, Китай) после предварительной фрагментации молекул ДНК с использованием системы BioRuptor (Diagenode, Милуоки, США) и наборов MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (Wuhan MGI Tech Co., Ltd, Ухань, Китай) и MGISEQ-2000 PE150 High-throughput Sequencing Set (Wuhan MGI Tech Co., Ltd, Ухань, Китай). Полученные единичные прочтения были собраны в контиги с помощью программы Unicycler 0.5.0 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Геномные последовательности de novo представлены в базе данных GenBank (таблица).

Данные полногеномного секвенирования изолятов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, выделенных из крови пациентов, будут использованы в последующих работах для анализа принадлежности данных изолятов к определенным капсульным типам и генетическим линиям, филогенетического анализа, выявления в геномах профаговых областей и генов, кодирующих профаговые деполимеразы, определения наличия в геномах генетических детерминант факторов вирулентности и устойчивости к антимикробным препаратам.

Информация об исследованиях, в которых в качестве объектов выступали люди

В соответствии с требованиями Биоэтического комитета Российской Федерации, в работе использованы клинические изоляты *A. baumannii* и *K. pneumoniae* без указания персональных данных пациентов, таких как имя, дата рождения, адрес, история болезни и др.

Information on studies where human subjects were used

In accordance with the requirements of the Bioethics Committee of the Russian Federation, the work used clinical isolates of *A. baumannii* and *K. pneumoniae* without specifying personal data of patients, such as name, date of birth, address, medical history, etc.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках: федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» соглашение №141-02-2023-290.

Financial support

The work was carried out within the framework of the federal project “Sanitary Shield – health safety (prevention, detection, response)” agreement No 141-02-2023-290.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*. 2021 Oct 12;10(10):1310. DOI: 10.3390/pathogens10101310

2. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Mar 12;9(3):119. DOI: 10.3390/antibiotics9030119
3. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2024. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240093461>
4. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538-82. DOI: 10.1128/CMR.00058-07

Информация о соавторах:

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

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

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Соломенцев Виктор Иванович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сизова Анжелика Алексеевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Лазарева Елена Борисовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского

Черненко Татьяна Витальевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией клинической микробиологии НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского

Попова Анастасия Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

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

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

Anastasia Yu. Lebedeva, Junior Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Victor I. Solomentsev, Junior Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anzhelika A. Sizova, Junior Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Research Scientist of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elena B. Lazareva, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of Clinical Microbiology Laboratory, Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine

Tatyana V. Chernenkaya, MD, PhD, Head of the Clinical Microbiology Laboratory, Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine

Anastasia V. Popova, PhD in Biological Sciences, Leading Research Scientist of Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

XI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» – 29 ноября 2024 г. Орехово-Зуево – Электрогорск

Традиционно, как и одиннадцать лет тому назад, в последнюю пятницу ноября теперь уже 2024 года на базе Государственного гуманитарно-технологического университета и АО «ЭКОлаб» прошла одиннадцатая по счету научно-практическая конференция, посвященная перспективам внедрения инновационных технологий в медицину и фармацию, вызвавшая значительный интерес у научного бизнес-сообщества. Также традиционно, совместными организаторами и инициаторами Конференции явились руководители образовательного учреждения – Государственного гуманитарно-технологического университета (ГГТУ) и акционерного общества разработчиков и производителей медицинских изделий и лекарственных препаратов АО «ЭКОлаб».

На открытии Конференции с приветственным словом выступили ректор ГГТУ и Генеральный директор АО «ЭКОлаб», подчеркнув этим неразрывную связь образования, науки и практики. Именно это было подчеркнуто в выступлении нового ректора университета, доктора педагогических наук Галины Николаевны Скударёвой, отметившей ведущую роль профессорско-преподавательского коллектива фармацевтического факультета и его декана Валентины Алексеевны Киселевой в подготовке квалифицированных специалистов для нужд фармацевтических предприятий, в том числе и в первую очередь для научных и производственных потребностей АО «ЭКОлаб», где сегодня на различных должностях трудятся их бывшие выпускники – лаборанты, аспиранты, кандидаты наук и руководители производств.

Всего в работе конференции выступило с докладами в режиме online более 120 участников из различных регионов России, бывших республик СССР и стран дальнего зарубежья, что дает право считать конференцию международной. Следует подчеркнуть, что дистанционное общение участников конференции оказалось эффективным, не смотря на отсутствие прямого общения с докладчиками и коллегами из других стран и регионов.

Идея организации Конференции достаточно актуальна – все вузы по уставу и одобрению Учредителя (в данном случае Министерства образования Московской области) регулярно проводят научные студенческие форумы с участием ведущих ученых и специалистов в своей области. Таким образом, декан только что организованного в 2013 году фармфакультета В.А.Киселева одновременно зарегистрировала в областном Министерстве Конференцию с названием, дожившим до сегодняшнего дня: «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации». В последующем, деканат выступил инициатором выпуска научно-практического журнала с аналогичным содержанием.

Идею проведения ежегодных конференций и выпуска периодического издания, в том числе сборников материалов конференций, инициативно подхватил Президент АО «ЭКОлаб». Доктор медицинских наук Сейфаддин Гашимович Марданлы, одновременно являющийся профессором кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ, сумел привлечь к работе конференции ведущих ученых и специалистов из ведущих зарубежных и отечественных научных и производственных центров. В настоящее время в организационный комитет Конференции кроме ГГТУ и АО «ЭКОлаб» входят: Общероссийская общественная организация «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов», председатель д.м.н., профессор, академик РАН Василий Геннадиевич Акимкин; Ассоциация «Национальное научно-практическое общество бактериологов», председатель д.м.н., профессор, академик РАН, Иван Алексеевич Дятлов; ФГБОУ ВО Минздрава России Ростовский государственный медицинский университет в лице заведующей кафедрой микробиологии и вирусологии №2, д.м.н., профессора Галины Георгиевны Харсеевой. Кроме того, в работе Конференции и её организации принимают активное участие научно-исследовательские институты Роспотребнадзора и Минздрава России, ведущие образовательные учреждения, производители медицинских изделий и лекарственных препаратов из Москвы, Санкт-Петербурга, Самары, Уфы, Краснодара, Ростова-на-Дону, Томска, Азербайджана, Узбекистана, Казахстана, Германии, Испании и др. Так же, более 60 профессоров, докторов наук и академиков российской и зарубежных академий наук вошли в состав редакционных советов наших журналов и оргкомитетов Конференций.

Эта конференция, как и прошлые, была проведена в течение одного дня в формате одного пленарного заседания и трех секций. Секции были организованы исключительно для удобства докладчиков, без жесткой тематической привязки по научным дисциплинам, что позволило ретроспективно оценить предложенные на сегодняшнее рассмотрение инновации в медицине и фармации. Лозунг: «Пусть расцветут сто цветов, пусть соперничают сто школ», использованный почти 80 лет назад Мао Цзедун, чтобы вызвать интерес у китайской интеллигенции к объединению различных философских школ, как никогда подошел к программе конференции, соединившей в одном ключе доклады инфекционистов, микробиологов, бактериологов, биотехнологов, фармакологов, биохимиков, клиницистов, преподавателей и студентов.

Пленарное заседание с обстоятельным и высокопрофессиональным докладом «Биобезопасность и геномный эпидемиологический надзор» выступил ведущий российский уче-

ный-эпидемиолог, академик РАН, директор ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора А.Г.Акимкин, ознакомивший слушателей с проблемами и достижениями отечественной и мировой эпидемиологии.

С не менее важной темой «Разработка современных средств диагностики и профилактики актуальных инфекций с применением генно-инженерных подходов» выступил известный российский учёный в области медицинской микробиологии, академик РАН, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», И.А.Дятлов.

В заключение, с научно-практическим докладом в высокотехнологичной сфере клиничко-лабораторной диагностики «Оптические методы количественного анализа», выступил признанный эксперт в области клинической биохимии, иммунохимии, исследовании гемостаза, лабораторного оборудования и вопросов организации лабораторной службы, профессор кафедры ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», д.м.н., профессор Владимир Владимирович Долгов.

Секцию № 1 открыл ее ведущий – Президент АО «ЭКОлаб», д.м.н., профессор С.Г.Марданлы, докладом на актуальную сегодня тему: «Антиоксический иммунитет против дифтерии». Сопредседатель секции была д. фарм. н., доцент, заведующая кафедрой ОФ и БМТ ФГАУ ВО РУДН С.Н.Суслина.

Дифтерия, «болезнь плача матерей», «болезнь ужаса матерей» до открытия антибиотиков была одной из причин высокой детской смертности. Постановление Главного государственного санитарного врача России о 95% вакцинации россиян от дифтерии (от ковида планировалось 60%!) было подписано еще 8 февраля 2023 г., хотя стало достоянием общественности только в марте. Это сложный социально-экономический процесс. И это крайне актуально для научных конференций, где можно выразить своё мнение и каким-то образом продвинуть научные предложения к их скорейшей реализации.

Вакцинация сегодня особенно актуальна для детского и взрослого населения Ростовской, Брянской, Курской области. Дифтерия забыта, но не исчезла. «Это настолько редкая инфекция в современном мире, что даже среди врачей едва ли найдутся те, кто лично наблюдал ее симптомы». В России случаи этого заболевания единичны на протяжении вот уже нескольких лет. В то же время, нельзя забывать, что миграция серьезно активизировалась, а с ней и возможности трансграничного переноса. На многих соседних с нами территориях (в том числе и на бывших украинских) сложная эпидемиологическая обстановка. На них много лет не проводились многоплановые, осознанные профилактические мероприятия. Не было вакцинации и от таких опасных заболеваний, как корь, дифтерия, туберкулез и многих других.

С докладами о разработке новых медицинских изделий для диагностики актуальных инфекций выступили ученики и коллеги профессора С.Г.Марданлы, а также известные ученые из других дружественных научных коллективов: ФБУН НИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, ВМА МО им. С.М.Кирова, ФБУН ГНЦ ПМБ, ФГБОУ НГМУ, ФГАУ ВО РУДН и др. Республика Азербайджан была представлена докладами советника «Института биоресурсов» д.б.н., профессором, академиком НАНА, Т.Г.Талыбовым, старшим преподавателем

Нахчыванского Госуниверситета Э.С.Исмаиловым и старшим преподавателем факультета ветеринарной медицины Азербайджанского Аграрного университета. Всего на Секцию №1 было заявлено 32 сообщения.

Секцию № 2 открыл профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин фармацевтического факультета ГГТУ, д.т.н., профессор В.В. Помазанов. Было заявлено 35 сообщений, из которых 8 докладов принадлежали сотрудникам ФГБНУ ВИЛАР, 10 – сотрудникам, аспирантам и студентам ГГТУ и АО «ЭКОлаб», остальные научным сотрудникам и студентам РГТУ, РУДН, ИМГУ им. И.М.Сеченова, МГУ им. М.В.Ломоносова, ФБУН ГНЦ ПМБ, ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского, ФГБУ «ФНКЦ КМ» ФМБА России и др.

Маститные учёные и молодые специалисты, аспиранты и студенты проиллюстрировали научной общественности последние достижения (свои и своей организации) в области фармации, фармакогнозии, клинической лабораторной диагностики. Например, подавляющее количество исследований, характеризующее научно-практическое направление исследований института ВИЛАР, было посвящено исследованию фармакологических свойств различных растительных экстрактов, что вызвало несомненный интерес у слушателей.

Достаточно интересно сопоставить работы ученых из различных институтов (ФБУН НИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, ФБУН ГНЦ ПМБ и АО «ЭКОлаб») по созданию новых средств диагностики на примере вагинальной инфекции с помощью трёх различных методов (хромато-масс-спектрометрии, полимеразной цепной реакции и идентификации бактерий с использованием селективных питательных сред), резко отличающихся как по принципу анализа, так и по другим техническим характеристикам, включая доступность, чувствительность, экспрессность, достоверность и, особенно, стоимость анализа, имеющих принципиальное значение при внедрении метода в клиничко-лабораторную практику.

Определённый интерес вызвали инновационные работы сотрудников и аспирантов ГГТУ и АО «ЭКОлаб» в области исследования и разработки принципиально новых биологически активных добавок с использованием в технологии их производства новых физико-химических (электрохимических) и микробиологических факторов, резко увеличивающих качество, эффективность и сроки хранения синбиотиков.

Секцию № 3. возглавили: заведующая кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин фармфакультета ГГТУ профессор Т.В. Попова и заместитель декана фармфакультета С.И.Зыкова. Все 18 сообщений были подготовлены исключительно студентами 3–5 курса под научным руководством преподавателей двух кафедр ГГТУ. Необходимо отметить, что представленные доклады выглядели излишне ученическими. Наиболее интересные доклады студентов в этот раз заслушивались на второй (взрослой) секции.

Заключительным аккордом Конференции явилось традиционное выступление врача высшей категории из ГБУЗ «Краевой центр охраны здоровья семьи и репродукции» Минздрава Краснодарского края, к.м.н. И.Н.Анисковой и заведующего кафедрой микробиологии и вирусологии

ФГБОУ ВО Башкирского Государственного медицинского университета Минздрава России, д.м.н., профессора М.М.Туйгунова. Дискуссию поддержали члены Оргкомитета во главе с его председателем профессором С.Г.Марданлы, сделавшие основные выводы и пожелания по проведённой конференции, выразившие надежду на дальнейшие плодотворные встречи, новые интересные доклады старых и особенно новых участников конференции.

Документально Решение по проведенной Конференции с пожеланиями и предложениями в инстанции – не оформлялось в связи с их малой, как показала многолетняя практика, эффективностью и результативностью. Самый лучший показатель деятельности научных форумов – это постоянный рост числа участников, качество и новизна поступающих

научных докладов, с возможностью их публикации в реферируемых изданиях.

Оргкомитет Конференции и редакция журнала «Известия ГГТУ» подготовили к публикации реферируемый сборник материалов конференции. До очередной встречи на традиционной Конференции «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» в последнюю пятницу ноября 2025 года!

Помазанов Владимир Васильевич,
доктор технических наук,
профессор кафедры фармакологии
и фармацевтических дисциплин ГГТУ,
Орехово-Зуево, Россия.

НОВОСТИ НАУКИ

Колибактин-продуцирующая *E. coli* влияет на географию онкозаболеваний

Биомедицинские исследования выявили бактериальный метаболит колибактин как причинный фактор риска для нескольких типов рака, в частности, колоректального рака. Известно, что колибактин стимулирует онкогенез, вызывая двухцепочечные разрывы в ДНК эпителиальных клеток, подвергшихся воздействию бактерий, продуцирующих колибактин. Некоторые *Escherichia coli* филогруппы B2 секретируют колибактин во время межбактериальной войны, одновременно подвергая хозяина повышенному риску повреждения ДНК. Распространенность доминирующих линий *E. coli*, продуцирующих колибактин, значительно различается в разных географических регионах. Распространенность также тесно связана со стандартизированными по возрасту случаями колоректального рака, рака мочевого пузыря и рака простаты, что позволяет предположить, что степень воздействия колибактина в популяции может способствовать географическому изменению этих видов рака. Наши наблюдения дают мощный импульс для дальнейших исследований и разработки новых вмешательств, направленных на снижение риска возникновения рака, связанного с колибаكتином.

Mäklin T, Taira A, Arredondo-Alonso S, Shao Y, Stratton MR, Lawley TD, et al.
Geographical variation in the incidence of colorectal cancer and urinary tract cancer is associated with population exposure to colibactin-producing Escherichia coli.
Lancet Microbe. 2024 Nov 16:101015. DOI: 10.1016/j.lanmic.2024.101015

Контакт с животными в младенчестве предотвращает развитие аллергии

Выращивание на ферме было связано с более высоким соотношением анаэробных и факультативных бактерий в первую неделю, меньшими популяциями *Escherichia coli* у колонизированных детей в первые месяцы жизни и менее частой колонизацией *Clostridioides difficile* в возрасте 12 мес. Наличие домашних животных в доме было связано с более частой колонизацией *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Bacteroides* в первые месяцы. Более высокое соотношение анаэробных и факультативных бактерий в возрасте одной недели, ранняя колонизация *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Bacteroides* и сниженное носительство *C. difficile* в возрасте 4–12 месяцев – все это отрицательно коррелировало с последующей диагностикой аллергии.

Показывают, что более низкие показатели аллергии у детей, растущих на фермах или с домашними животными, могут быть связаны с ранним установлением типичных анаэробных комменсалов в их кишечной микробиоте. Однако для подтверждения этих наблюдений в этом исследовании небольшой возрастной группы необходимы дополнительные исследования.

Ljung A, Gio-Batta M, Hesselmar B, Imberg H, Rabe H, Nowrouzian FL, et al.
Gut microbiota markers in early childhood are linked to farm living, pets in household and allergy.
PLoS One. 2024 Nov 27;19(11):e0313078. DOI: 10.1371/journal.pone.0313078

Леонид Иванович Маринин (к 90-летию со дня рождения)



13 января 2025 г. исполнилось 90 лет ведущему научному сотруднику лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ Леониду Ивановичу Маринину.

Леонид Иванович – старейший сотрудник Центра, его трудовой стаж превышает 60 лет.

В 1958 г. он окончил Военно-морской факультет при 1-м Ленинградском медицинском институте им. И.П.Павлова по специальности «лечебное дело и санитария». Свою исследовательскую деятельность по сибирской язве начинал в 1961 г. под руководством лауреата Сталинской премии А.Л.Тамарина, одного из создателей вакцины СТИ. В 1968 г. он защищает диссертацию и становится кандидатом медицинских наук, в 1973 г. ему присваивается ученое звание «старший научный сотрудник».

В ГНЦ прикладной микробиологии Л.И.Маринин работает с 1986 г. – сначала в должности начальника лаборатории, затем в течение 17 лет руководил отделом. В период 2006–2017 гг. – заведующий лабораторией микробиологии сибирской язвы, с 2017 г. – ведущий научный сотрудник.

Леонид Иванович – автор более 300 научных работ, посвященных микробиологии, профилактике, диагностике, пато- и иммуногенезу сибирской язвы, а также разработке технологии производства сибиреязвенной вакцины и обеспечению безопасности работ с возбудителями опасных инфекций.

Маринин Л.И. – автор ряда монографий, в которых обобщены сведения отечественной и зарубежной литературы и результаты собственных многолетних исследований возбудителя сибирской язвы, учебно-методических пособий, методических указаний, санитарных правил и патентов.

За разработку препарата и метода аэрогенной иммунизации людей жидкой регидратированной сибиреязвенной вакциной в 1976 г. Л.И.Маринин был награжден орденом «Знак почета».

В 2022 г. руководство Роспотребнадзора награждает Л.И.Маринина памятной медалью «100 лет Госсанэпидслужбе России».

Несмотря на солидный возраст, Леонид Иванович Маринин продолжает трудиться. Его последний фундаментальный труд «Сибирская язва вчера и сегодня» (Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Фирстова В.В. Сибирская язва вчера и сегодня. Оболенск; Москва: Династия, 2022. 647 с.) уже стал бестселлером. В настоящее время готовится к публикации новая монография ветерана, в которой он разместил и личные воспоминания. Леонид Иванович всегда доброжелателен, готов помочь коллегам по работе, щедро делится своими знаниями и передает бесценный опыт молодому поколению исследователей, пользуется заслуженным уважением и любовью в коллективе.

*Руководство и сотрудники Л.И.Маринина,
а также редакционная коллегия журнала «Бактериология», постоянным автором которого
он является, желают ему здоровья, хорошего настроения и новых творческих достижений!*

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 отправляется авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

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

Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10

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

Подписку на журналы Издательства «Династия» можно оформить:

В любом почтовом отделении России по объединенному каталогу «Пресса России»

Вопросы практической педиатрии	Индекс: 87946	Инфекционные болезни	Индекс: 12919
Вопросы детской диетологии	Индекс: 12917	Вопросы диетологии	Индекс: 90955
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	Индекс: 12916	Вопросы урологии и андрологии	Индекс: 91823

Через альтернативные подписные издательства

ООО «Урал-Пресса» – www.ural-press.ru
Электронный каталог «Пресса России» – www.pressa-rr.ru

**Через сайт издательства www.phdynasty.ru для физических лиц
и через издательство для юридических лиц
с любого номера текущего года на любой период**

Наименование журнала	Для физических лиц		Для юридических лиц	
	руб./полугодие	руб./год	руб./полугодие	руб./год
Вопросы практической педиатрии	1800	3600	2400	4800
Вопросы детской диетологии	1800	3600	2400	4800
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	1800	3600	2400	4800
Инфекционные болезни	1200	2400	1600	3200
Вопросы диетологии	1200	2400	1600	3200
Вопросы урологии и андрологии	1200	2400	1600	3200

ВНИМАНИЕ!

Для выставления счета юридическим лицам достаточно прислать заявку по e-mail: podpiska@phdynasty.ru
В заявке необходимо обязательно указать реквизиты организации, название журнала, период подписки, контактный телефон, e-mail и ответственное лицо.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, тел./факс: (495) 660-6004
e-mail: podpiska@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru