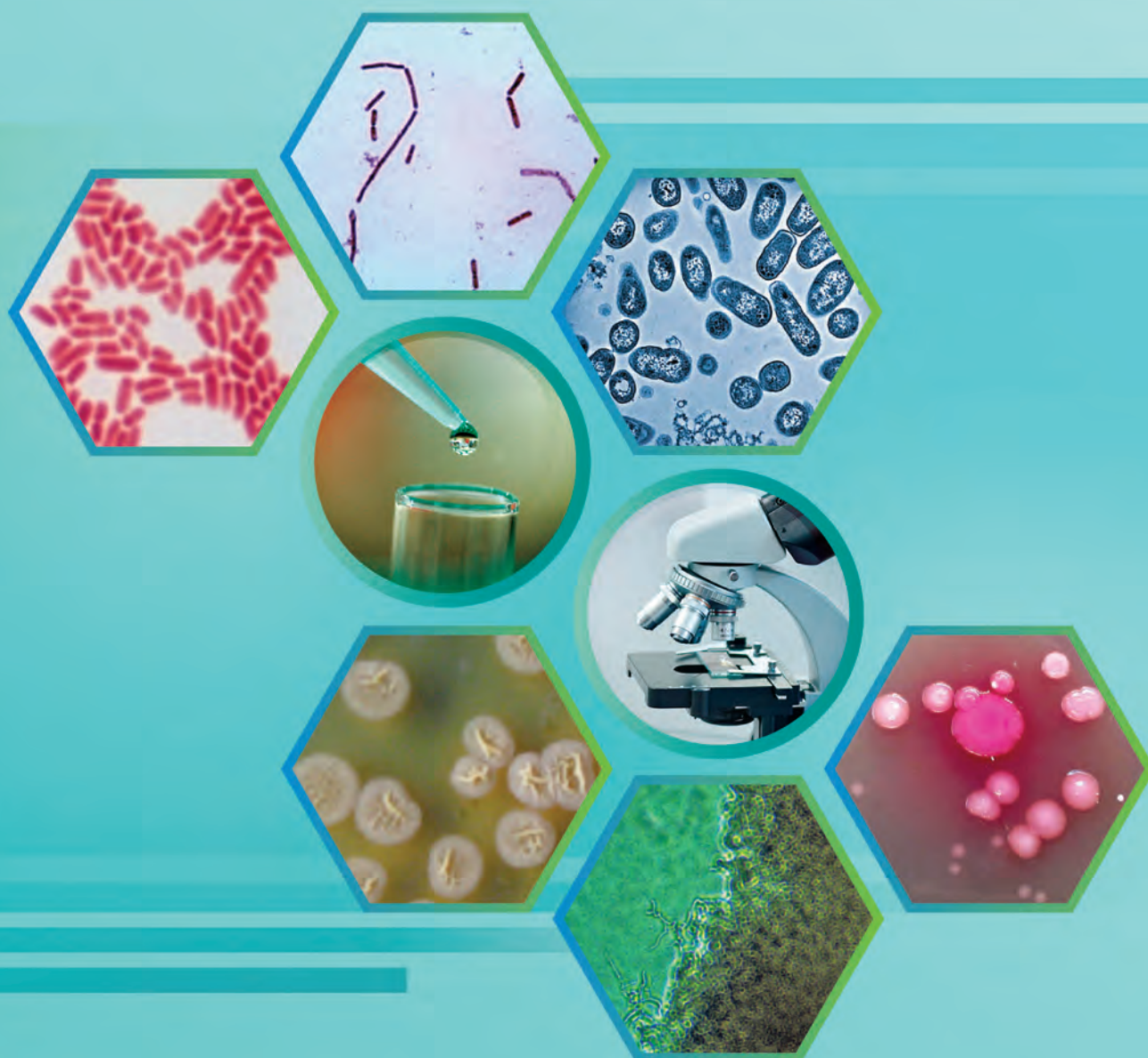


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2025 • том 10 • №2

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 30.06.2025

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 1440 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

Биологическая безопасность и биотехнологические процессы	5
--	---

Экспериментальные статьи

Получение и характеристика моноклональных антител к шигатоксину 2-го типа М.А.Шкуратова, О.В.Калмантаева, Н.А.Зенинская, А.Е.Хлынцева, Н.Н.Карцев, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, А.А.Ершова, М.А.Марьин, О.В.Коробова, А.И.Борзилов, Э.А.Светоч, В.В.Фирстова	8
Характеристика качественного состава комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в перспективе использования его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета С.Е.Гостищева, Н.В.Абзаева, Д.А.Ковалев, А.В.Костроминов, А.М.Жиров, Е.Л.Ракитина, М.В.Костюченко, О.В.Логвиненко, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, М.А.Иванова, Т.М.Гридина	15
Характеристика генетической природы устойчивости <i>Vibrio cholerae</i> к теллуру С.О.Водопьянов, А.В.Евтеев, М.И.Ежова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, В.Д.Кругликов	22
Оценка вибриоциногенной активности ctx^+ и ctx^- штаммов <i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы в планктонной форме и в составе биопленок Е.А.Меньшикова, С.В.Титова, С.О.Водопьянов, Н.А.Селянская, Л.А.Егиазарян, В.Д.Кругликов	28
Секвенирование как метод новых технологий в диагностике особо опасных и природно-очаговых инфекций на современном этапе Е.Е.Бжитских, А.А.Оплеухин, С.Б.Такысова, А.Ю.Югушев, Г.Х.Базарова, Е.Н.Рождественский, П.П.Санаров, Е.С.Полковников, А.В.Денисов, А.А.Киреев, Н.Ю.Красавина, И.Л.Григорьева, Н.В.Сапкаускас, Е.И.Филатов	33
Микробиоценоз кожи у лиц с пиодермией и микробной экземой Ж.Г.Еремеева, А.Р.Фахуртдинова, О.А.Степнова, Е.О.Иванова, О.В.Платонова, М.Е.Гатауллина, Р.З.Ибрагимова, Е.В.Бильдюк, Г.Г.Вафина, И.К.Минуллин	38
Фенотипические проявления и молекулярно-генетические особенности антибиотикорезистентности клинических изолятов <i>Enterococcus</i> spp. Н.А.Гординская, Е.В.Борискина, Е.В.Беляева, А.Е.Алексеева, Д.В.Кряжев, Н.Н.Зайцева	45
Оценка способности штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Staphylococcus haemolyticus</i> образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотическом субстрате в эксперименте С.В.Титова, А.С.Анисимова, Н.В.Аронова	50
Молекулярно-генетический анализ штаммов <i>Salmonella enterica</i> , выделенных в Донецкой Народной Республике в 2022–2023 гг. А.М.Горох, А.С.Водопьянов, А.А.Герасименко, Р.В.Писанов	60
Сравнительный анализ методов генотипирования штаммов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> А.А.Ковалевич, Р.В.Писанов, А.С.Водопьянов	67
Геномы штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных от пациентов многопрофильных стационаров в Республике Беларусь в 2016–2022 гг. А.Е.Соломенцева, Е.В.Карпова, М.В.Фурсов, Д.В.Волков, А.А.Кисличкина, Л.А.Шишкина, Д.В.Тапальский, Н.К.Фурсова	74
Молекулярная эпидемиология штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> , ассоциированных со вспышками пищевой инфекции в Российской Федерации И.В.Абаев, Ю.П.Скрябин, Д.М.Лощинин, М.А.Евсеева, А.Д.Фурсова, И.П.Мицевич, Е.Э.Люлина, А.А.Сизова, Т.Н.Мухина	79
Морфобиохимические и пробиотические исследования дрожжевого изолята рода <i>Metschnikowia</i> spp. А.Ю.Солина, О.А.Артемяева	87
Характеристика литического бактериофага KpV17Sk1f – нового представителя рода <i>Drulisvirus</i> , активного против <i>Klebsiella pneumoniae</i> капсульного типа K23 Н.В.Колупаева, А.А.Сизова, Е.Б.Лазарева, Т.В.Черненькая, Н.Е.Сузина, Н.В.Воложанцев	93

Обзор

Факторы патогенности <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> : мишени для аттенуации при создании живых и векторных вакцин А.С.Трунякова, А.С.Вагайская, С.В.Дентовская	103
---	-----

Образовательная деятельность

Опыт реализации программы профессиональной переподготовки по специальности «медицинский микробиолог» Е.А.Михайлова, Л.М.Азнабаева, О.О.Жеребятёва, Т.В.Чернышева	108
---	-----

Юбилей

К 70-летию профессора Сейфадинна Гашимовича Марданлы	113
К 85-летию профессора Эдуарда Арсеньевича Светоча	114

Правила оформления статей (основные положения)	115
--	-----

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

Biosafety and biotechnological processes	5
--	---

Experimental Articles

Production and characterization of monoclonal antibodies to shiga toxin type 2 <i>M.A.Shkuratova, O.V.Kalmantaeva, N.A.Zeninskaya, A.E.Khlyntseva, N.N.Kartsev, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, A.A.Ershova, M.A.Maryin, O.V.Korobova, A.I.Borzilov, E.A.Svetoch, V.V.Firstova</i>	8
Characteristic of the quality composition of the water-soluble antigen complex of the plague microbe. Prospects for using the water-soluble antigenic complex in evaluating the formation of post-vaccinal anti-plague immunity <i>S.E.Gostischeva, N.V.Abzaeva, D.A.Kovalev, A.V.Kostrominov, A.M.Zhirov, E.L.Rakitina, M.V.Kostuchenko, O.V.Logvinenko, D.G.Ponomarenko, D.V.Rusanova, M.A.Ivanova, T.M.Gridina</i>	15
Characterization of the genetic nature of <i>Vibrio cholerae</i> resistance to tellurium <i>S.O.Vodopyanov, A.V.Evteev, M.I.Yezhova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, V.D.Kruglikov</i>	22
Assessment of vibriocinogenic activity of <i>ctx⁺</i> and <i>ctx⁻</i> strains of <i>Vibrio cholerae</i> O1 serogroup in planktonic form and in biofilm composition <i>E.A.Menshikova, S.V.Titova, S.O.Vodopyanov, N.A.Selyanskaya, L.A.Egiazaryan, V.D.Kruglikov</i>	28
Sequencing as a method of new technologies in the diagnosis of particularly dangerous infections and natural focal infections at the present stage <i>E.E.Bzhitskikh, A.A.Opleukhin, S.B.Takysova, A.Yu.Yugushev, G.Kh.Bazarova, E.N.Rozhdestvensky, P.P.Sanarov, E.S.Polkovnikov, A.V.Denisov, A.A.Kireev, N.Yu.Krasavina, I.L.Grigorieva, N.V.Sapkauskas, E.I.Filatov</i>	33
Skin microbiocenosis in persons with pioderma and microbial eczema <i>Zh.G.Eremeeva, A.R.Fakhurtdinova, O.A.Stepnova, E.O.Ivanova, O.V.Platonova, M.E.Gataullina, R.Z.Ibragimova, E.V.Bildyuk, G.G.Vafina, I.K.Minullin</i>	38
Phenotypic manifestations and molecular-genetic features of antibiotic resistance of clinical isolates of <i>Enterococcus</i> spp. <i>N.A.Gordinskaya, E.V.Boriskina, E.V.Belyaeva, A.E.Alekseeva, D.V.Kryazhev, N.N.Zaytseva</i>	45
Evaluation of the ability of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus haemolyticus</i> strains to form mono- and binary biofilms on an abiotic substrate in an experiment <i>S.V.Titova, A.S.Anisimova, N.V.Aronova</i>	50
Molecular genetic analysis of <i>Salmonella enterica</i> strains isolated in the Donetsk People's Republic in 2022–2023 <i>A.M.Gorokh, A.S.Vodopyanov, A.A.Gerasimenko, R.V.Pisanov</i>	60
Comparative analysis of methods of genotyping <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains <i>A.A.Kovalevich, R.V.Pisanov, A.S.Vodopyanov</i>	67
Genomes of <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains isolated from patients of multidisciplinary hospitals in the Republic of Belarus in 2016–2022 <i>A.E.Solomentseva, E.V.Karpova, M.V.Fursov, D.V.Volkov, A.A.Kislichkina, L.A.Shishkina, D.V.Tapalsky, N.K.Fursova</i>	74
Molecular epidemiology of <i>Staphylococcus aureus</i> strains associated with foodborne infection outbreaks in the Russian Federation <i>I.V.Abaev, Y.P.Skryabin, D.M.Loschinin, M.A.Evseeva, A.D.Fursova, I.P.Mitsevich, E.E.Lyulina, A.A.Sizova, T.N.Mukhina</i>	79
Morphobiochemical and probiotic studies of a yeast isolate of the genus <i>Metschnikowia</i> spp. <i>A.Yu.Solina, O.A.Artemyeva</i>	87
Characteristics of the lytic bacteriophage KpV17Skliif, a new member of the genus <i>Drulisvirus</i> , active against <i>Klebsiella pneumoniae</i> of the K23 capsular type <i>N.V.Kolupaeva, A.A.Sizova, E.B.Lazareva, T.V.Chernenkaya, N.E.Suzina, N.V.Volozhantsev</i>	93

Review

Pathogenicity factors of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> : targets for attenuation in the creation of live and vector vaccines <i>A.S.Trunyakova, A.S.Vagaitskaya, S.V.Dentovskaya</i>	103
--	-----

Educational activities

Experience in implementing a program of professional retraining in the specialty of medical microbiology <i>E.A.Mikhailova, L.M.Aznabaeva, O.O.Zherebyateva, T.V.Chernysheva</i>	108
---	-----

Jubilees

To the 70 th anniversary of birth Professor Seyfaddin G. Mardanly	113
To the 85 th anniversary of birth Professor Eduard A. Svetoch	114

Instructions for Authors	115
--------------------------------	-----

Биологическая безопасность и биотехнологические процессы

Современная биотехнология представляет собой синтетическую науку, интегрирующую знания из разных научных дисциплин и имеющую конечную цель – получение продуктов биологического синтеза, важных для человека, в достаточных для обеспечения его потребностей количествах.

С точки зрения фундаментальных и прикладных разработок в данной области ее можно разделить на научную (исследовательскую) и технологическую части (собственно производство продукта). Научная составляющая в современных разработках связана с развитием методологий молекулярной биологии, генетики, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, геномной инженерии, генетическим редактированием, т.е. с теми, которые могут приводить к созданию продуцентов или искусственному синтезу важных для отдельных отраслей промышленности биологических структур. Масштабируемые технологии получения таких продуктов строятся на разработках, имеющих целью промышленный выпуск биологических соединений или живых объектов с использованием большого арсенала современных методологий и оборудования.

Понятие биологической безопасности биотехнологических процессов связано со свойствами используемых в производстве микроорганизмов, наиболее значимыми из которых являются вирулентность (степень патогенности), наличие генетических структур, которые могут быть бесконтрольно распространены в окружающей среде, и возможность попадания новых вариантов микроорганизмов в естественные экосистемы с непредсказуемыми последствиями.

Благодаря развитию современных методологий создания продуцентов ключевых молекул микроорганизмов, например антигенов для вакцин, нет необходимости в культивировании патогенов в больших масштабах. Вместе с тем в некоторых случаях такая необходимость может возникнуть при экстренном создании средств специфической профилактики, когда невозможно клонирование какого-либо протективного компонента в силу недостаточности информации или методологий. Кроме того, требования к производственным процессам получения даже клонированных компонентов вакцин приводят к необходимости создания условий для нераспространения продуцентов. Так, продуценты антигенов патогенов I–II групп патогенности, даже полученные на авирулентных культурах (например, *Escherichia coli*), относятся к III группе патогенности, что приводит к необходимости соблюдения требований санитарных правил для этой группы. При этом возникает коллизия, связанная с требованиями к производственным процессам по стандартам GMP, где в помещениях применяется положительное давление. Для выращивания культур, формально относящихся к III группе (продуценты), необходимо создание условий, обеспечивающих биологическую безопасность по стандартам BSL, где в производственном помещении применяется отрицательное давление. Разрешение таких противоречий требует разработки специальных конструктивных решений при организации производства. Мы сталкивались с такой проблемой при проектировании корпуса для производства рекомбинантных геномно-инженерных вакцин против возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы, и ее решение было совершенно нетривиальным с учетом еще и дополнительных затрат на проектировку производства, удовлетворяющего всем требованиям BSL и GMP.

Что касается возможности распространения значимых генетических структур в окружающей среде, то данная проблема в настоящее время стоит особенно остро. Попадание генетических структур, кодирующих факторы патогенности вирулентных штаммов, в окружающую среду представляет значительную биологическую опасность в связи с возможностью их распространения, интеграции в сапрофитные культуры и создания новых форм патогенов. Такие процессы уже наблюдаются в природных экосистемах, например морских, когда патогены передают факторы вирулентности сапрофи-



там. Предотвращение такого распространения может быть гарантировано при соблюдении требований ко всем видам процессов в производственной технологической цепочке, начиная с этапов накопления биомассы и посевного материала (пробирки, колбы, бутыли, миниреакторы) и заканчивая процессами масштабной ферментации, сепарации биомассы, выделения антигенов или ферментов, очистки компонентов и лиофилизации конечного продукта. Рассчитывать на то, что гены факторов патогенности или они сами в отходах производства могут быть уничтожены какими-либо химическими или ферментативными методами, не стоит, здесь всегда может быть «проскок» части значимых молекул или генов. Наиболее приемлемым обеззараживанием отходов производства в настоящее время считается обработка высокими температурами, позволяющими разрушить белки и весь значимый генетический материал. Определение полноты разрушения генетического материала необходимо проводить генно-диагностическими методами, например полимеразной цепной реакцией на гены вирулентности.

Возможность попадания новых вариантов микроорганизмов в естественные экосистемы при производственных процессах также должна быть исключена. В этом отношении наибольшую опасность в отношении закрепления в экосистемах новых видов микроорганизмов с непредсказуемыми последствиями представляют фитопатогены, в последнее время все более часто используемые при получении различных препаратов для данной области. Здесь наблюдается значительное отставание в обеспечении безопасности нераспространения в сравнении с областью производства вакцин. Проблема весьма значительна.

Существенную проблему представляет организация системы мер обеспечения безопасности персонала, задействованного в биотехнологических разработках, пилотных исследованиях по получению продуктов и, собственно, в производстве. В нашей стране защите персонала при проведении исследований с зараженным патогенами материалом, включая чистые культуры, всегда уделялось большое внимание, и, собственно, в России и были разработаны все основные принципы безопасной работы в лабораториях, которые в последующем распространились в других странах. Были разработаны методологии работы с патогенами, гарантирующие защиту окружающей среды от контаминации, и эти подходы в настоящее время успешно используются. В зависимости от степени биологической опасности живого объекта в мире принято разделять уровни лабораторий от самого простого до самого сложного, что обозначается как BSL (уровень биологической защиты) от 1 до 4. При биотехнологических разработках в лабораториях соблюдение установленных правил особенно важно, так как утечка патогенов может привести к тяжелым последствиям глобального характера, что мы наблюдали в последние годы на примере ковида.

Кроме того, при разработке иммунопрофилактических и лечебных препаратов неперенным условием является оценка протективности в острых опытах на животных, так как никакими *in vitro* методами достоверную информацию получить не удастся. Это также весьма чувствительная область в отношении рисков утечки патогенов, и условия должны быть тщательно соблюдены. По нашему опыту работы с зараженными животными, от мышей до крупных обезьян, можно сделать вывод, что при анализе, например, вакцин против особо опасных инфекций, когда задействованы сотни или даже тысячи зараженных животных, должны быть созданы особые условия физической и биологической защищенности, и существующие правила необходимо существенно пересмотреть, учитывая объемы работ и использование новых штаммов, обладающих свойствами суперпатогенности, контагиозности и устойчивости к лекарственным средствам. При масштабных биотехнологических процессах, где используются уже не вирулентные, а рекомбинантные штаммы, особую значимость приобретает возможность высокой алергизации персонала при работе с большими объемами биомассы и контакте с летучими метаболитами, отводимыми при аэрации, что может быть купировано созданием соответствующих условий при технологическом оснащении производства.

Для биологической безопасности на современном уровне развития науки представляется весьма значительной проблема возможности создания новых штаммов возбудителей – с повышенной вирулентностью и/или несущих комплекс факторов патогенности – и использования их в военных или террористических целях. Для готовности к решению такой проблемы необходимо создание комплекса биотехнологических разработок, от лабораторных исследований до пилотных полупроизводственных процессов, позволяющих в короткие сроки создать средства противодействия таким патогенным биологическим агентам. К средствам противодействия следует отнести прежде всего вакцины, которые можно применять в сочетании с превентивным введением антибиотиков. Часть платформ для ускоренной разработки в отношении рекомбинантных генно-инженерных вакцин против бактериальных патогенов уже нами создана (белковые, полисахаридные, живые аттенуированные, а также на основе клеточных теней и везикул), созданы и алгоритмы быстрой разработки технологий получения таких вакцин в пилотных условиях с последующим масштабированием для массового выпуска.

Разработка рекомбинантных, полностью человеческих моноклональных антител для купирования токсических состояний, вызванных токсинами, значимыми для биологической безопасности, и создание соответствующих производств также являются одной из приоритетных задач. Это биотехнологическое направление представляется особенно важным в связи с тем, что многие факторы патогенности, которые могут быть индуцированы во вновь создаваемых штаммах, представляют собой токсические продукты или ферменты. Мы уже значительно продвинулись в отношении создания полностью отечественной линейки технологий для разработки таких антител на основе иммунокомпетентных плазмобластов, что вылилось в получение моноклонов против рицина, шигатоксина второго типа, ботулотоксина, сибиреязвенного летального токсина, а также против ковида. Линейка данных препаратов должна быть существенно расширена в ближайшие годы, что обеспечит возможность купирования заболеваний у людей, вызванных патогенами, сочетающими в себе несколько выраженных поражающих свойств, а также превентивного введения при угрозе применения.

Еще одно направление обеспечения биологической безопасности для биотехнологии хотелось бы отметить в связи с все нарастающей проблемой резистентности бактерий к лекарственным средствам. Новых антибиотиков нет давно, ко многим уже есть стойкая резистентность патогенов, замены им практически нет, возможно только использование сочетаний имеющихся антибиотиков для достижения эффекта. В связи с этим приобретает особую важность разработки препаратов, альтернативных антибиотикам или используемых вместе с ними, а также создание их масштабируемых производств. Группой препаратов для этих целей являются рекомбинантные фаговые ферменты – эндолизины и деполимеразы, а также катионные пептиды бактерий – бактериоцины. Нами уже создан стабильный продуцент стафилококкового эндолизина с высокими терапевтическими свойствами, показавший, кроме того, высокую экономическую эффективность в биотехнологических процессах его масштабного получения. Также созданы группы рекомбинантных деполимераз против многочисленных серовариантов клебсиелл и ацинетобактера и разработаны технологии производства этих препаратов, что может существенно помочь в решении проблемы резистентности этих широко распространенных инфекций. В отношении данной группы препаратов, с учетом уже разработанных лабораторных технологий, с целью решения наиболее острых проблем биобезопасности, необходимо приступить к расширению спектра данных препаратов, например в отношении спор и вегетативных клеток сибирской язвы. Проблема лечения сибирской язвы заключается не только в возможности заражения полирезистентными штаммами, но и в том, что при попадании спор аэрозольным способом в легкие человека введение антибиотиков малоэффективно, как это было установлено при аспирации порошков, содержащих споры, в США в 2001 г. Эндолизины, или пептидогликангидролазы, в этом отношении намного более эффективны, так как, по имеющимся данным, они действуют не только на вегетативные клетки, но и на споры. Задача создания такого эндолизина является сложной, но, с учетом уже накопленного опыта, вполне решаемой.

Технологии создания и масштабируемого производства рекомбинантных фаговых ферментов, а также бактериоцинов широкого спектра действия, разработанные в последние годы против ряда актуальных патогенов III–IV группы по национальной классификации, должны быть непременно использованы для получения аналогичных продуктов против особо опасных высококонтагиозных инфекций, представляющих первый эшелон биологической защиты населения.

Учитывая возросшие в последние годы возможности биотехнологии для манипулирования живыми системами и их метаболическими процессами с целью создания продуктов биологического происхождения или биологических объектов с новыми свойствами или функциями, а также трансдисциплинарность самого предмета биотехнологии, следует обратить особое внимание на возможности использования искусственного интеллекта и машинного обучения для предотвращения неправомерного использования биотехнологических продуктов, устранения условий создания новых поражающих агентов, а также обеспечения разработки средств, им противодействующих. Алгоритмы машинного обучения, использующие высокопроизводительные компьютерные системы, уже могут прогнозировать свойства и поведение биологических систем в тех или иных условиях. Проблеме использования искусственного интеллекта в сфере биотехнологии в мире уделяется большое внимание в плотной связи с биологической безопасностью, накоплен и продолжает собираться массив аналитических материалов, которые должны стать темой для обсуждения в одной из будущих публикаций в колонке главного редактора нашего журнала.

Главный редактор, академик РАН И.А.Дятлов

Получение и характеристика моноклональных антител к шигатоксину 2-го типа

М.А.Шкуратова, О.В.Калмантаева, Н.А.Зенинская, А.Е.Хлынцева, Н.Н.Карцев, Т.И.Комбарова,
Е.С.Перескокова, А.А.Ершова, М.А.Марьин, О.В.Коробова, А.И.Борзилов, Э.А.Светоч, В.В.Фирстова

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

Шигатоксин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) являются основными возбудителями геморрагического колита, который может привести к опасным для жизни осложнениям, включая гемолитико-уремический синдром. Введение в организм пациента моноклональных антител (МКА), специфичных к шигатоксину (Stx), считается перспективным подходом для профилактики или лечения STEC-инфекций. В связи с этим разработана МКА, нейтрализующих Stx, является актуальной задачей. Нами были получены три мышиных МКА (16D4, 5G4 и 5G8) и два крысиных МКА (R3 и R8), специфических к А-субъединице шигатоксина 2-го типа (Stx2). Моноклональные антитела 16D4, R3 и R8 обладают токсиннейтрализующей активностью в тестах с Vero и в тестах на животных. Введение МКА 16D4 совместно с фильтратом культуральной жидкости, содержащей нативный Stx2, в количестве 2, 4 и 8 среднелетальных доз (LD₅₀) способствовало снижению летальных исходов среди экспериментальных животных или увеличению показателя средней суточной гибели мышей. МКА 16D4 могут рассматриваться в качестве кандидатного препарата для терапии STEC-инфекций.

Ключевые слова: шигатоксины, Stx2, моноклональные антитела, специфичность, нейтрализация токсина

Для цитирования: Шкуратова М.А., Калмантаева О.В., Зенинская Н.А., Хлынцева А.Е., Карцев Н.Н., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ершова А.А., Марьин М.А., Коробова О.В., Борзилов А.И., Светоч Э.А., Фирстова В.В. Получение и характеристика моноклональных антител к шигатоксину 2-го типа. Бактериология. 2025; 10(2): 8–14. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-8-14

Production and characterization of monoclonal antibodies to shiga toxin type 2

M.A.Shkuratova, O.V.Kalmantaeva, N.A.Zeninskaya, A.E.Khlyntseva, N.N.Kartsev, T.I.Kombarova,
E.S.Pereskokova, A.A.Ershova, M.A.Maryin, O.V.Korobova, A.I.Borzilov, E.A.Svetoch, V.V.Firstova

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

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are the main causative agents of hemorrhagic colitis, which can lead to life-threatening complications, including hemolytic uremic syndrome. Injection of monoclonal antibodies (mAbs) specific to Shiga toxin (Stx) to patients is considered a promising approach for the prevention or treatment of STEC infections. In this regard, the development of Stx-neutralizing mAbs is an urgent task. We obtained three murine mAbs (16D4, 5G4, and 5G8) and two rat mAbs (R3 and R8) specific for the A-subunit of Shiga toxin type 2 (Stx2). Monoclonal antibodies 16D4, R3, and R8 exhibited toxin-neutralizing activity in Vero and animal assays. Injection of mAb 16D4 together with culture fermentation broth containing native Stx2 in the amount of 2, 4 and 8 median lethal doses (LD₅₀) contributed to a decrease in lethal outcomes among experimental animals or an increase in the average daily mortality rate of mice. MAb 16D4 can be considered as a candidate drug for the therapy of STEC infections.

Key words: shiga toxins, Stx2, monoclonal antibodies, specificity, toxin neutralization

For citation: Shkuratova M.A., Kalmantaeva O.V., Zeninskaya N.A., Khlyntseva A.E., Kartsev N.N., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ershova A.A., Maryin M.A., Korobova O.V., Borzilov A.I., Svetoch E.A., Firstova V.V. Production and characterization of monoclonal antibodies to shiga toxin type 2. Bacteriology. 2025; 10(2): 8–14. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-8-14

Для корреспонденции

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», 24
E-mail: shkuratova@obolensk.org
Телефон: (4967) 36-0003
ORCID: 0000-0001-8021-8453

Статья поступила 01.05.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov,
Moscow region, 142279, Russian Federation
E-mail: shkuratova@obolensk.org
Телефон: (4967) 36-0003
ORCID: 0000-0001-8021-8453

The article was received 01.05.2025, accepted for publication 30.06.2025

Шигатоксины (Stx) – семейство белков, продуцируемых бактериями рода *Shigella* (преимущественно *Shigella dysenteriae* серотипа 1) и некоторыми штаммами *Escherichia coli*, так называемыми шигатоксин-продуцирующими штаммами *E. coli* (Shiga toxin-producing *E. coli*/STEC). Штаммы STEC продуцируют шигатоксин 1-го типа (Stx1) и/или шигатоксин 2-го типа (Stx2). Белки Stx1 и Stx2 являются основным фактором патогенности данных бактерий. Эшерихиозы, вызванные штаммами STEC, в ряде случаев приводят к развитию геморрагического колита, гемолитико-уремического синдрома (ГУС) и неврологических осложнений. Наиболее тяжелые проявления заболевания наблюдаются у маленьких детей и пожилых людей [1].

Представители семейства шигатоксинов имеют сходную молекулярную структуру и состоят из одной А-субъединицы (~32–33 кДа, Stx2A), выполняющей ферментативную функцию, и пентамерного кольца (~38,5 кДа), которое включает 5 В-субъединиц (~7,7 кДа каждая, Stx2B), отвечающих за связывание с рецептором и проникновение токсина внутрь клетки. Основную роль в проявлении цитотоксичности выполняет А1-фрагмент субъединицы А, который инактивирует рибосомы и запускает каскад реакций, приводящих к апоптозу клетки [2].

В настоящее время не существует специфической профилактики развития ГУС или терапии интоксикации Stx. Лечение носит исключительно поддерживающий характер и включает регидратационную терапию и, при необходимости, диализ. Нейтрализация Stx до появления тяжелых симптомов выступает как один из перспективных подходов предотвращения развития ГУС. В таком случае эффективным методом профилактики заболевания для детей с риском возникновения ГУС является использование токсиннейтрализующих препаратов, например антител [3]. Ингибирование цитотоксичности шигатоксина обеспечивается путем либо блокирования связывания Stx-белков с клетками, либо вмешательства в любой из последующих этапов внутриклеточной транспортировки токсина к рибосоме [4].

Разработан ряд моноклональных антител (МКА), способных с разной степенью эффективности ингибировать Stx2. Только два МКА – urtoxazumab (TMA-15) и Shigamabs® (αStx1 и αStx2) – были протестированы U.S. Food and Drug Administration на людях и прошли 1-й этап клинических испытаний еще в 2010 и 2013 г. соответственно [5]. Поиск и разработка МКА, способных эффективно нейтрализовать шигатоксин, продолжаются, о чем свидетельствует ежегодное появление новых исследований [6].

Цель работы – получить моноклональные антитела, специфичные к Stx2, и провести анализ их нейтрализующей активности.

Материалы и методы

Шигатоксины

В работе использовали: рекомбинантные А- и В-субъединицы Stx2 (rStx2A, rStx2B), полученные в лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ [7], и фильтраты культуральной жидкости (КЖ), содержащей нативный Stx2, штамма *E. coli* серотипа O181:H4 (инв. № В-9427 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов

ФБУН ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболensk») [8, 9] и нативные Stx1 и Stx2 штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 51658 (инв. № 6842). В исследовании в качестве контроля также использовались фильтраты КЖ, не содержащей Stx2, штамма *E. coli* ATCC 25922 (инв. № В-2393).

Получение мышинных и крысиных моноклональных антител

Мышей линии BALB/c (самки, 16–18 г) иммунизировали белками rStx2A и rStx2B в количестве 50 мкг/мышь. Молодых самок крыс линии Wistar (6–8 нед.) иммунизировали rStx2A с расчетом 150 мкг белка на одно животное. Животные были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА (Андреевка, Россия). Проверку титра специфичности антител у иммунизированных животных проводили непрямой твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА). Связывание иммуноглобулинов (Ig) G с антигеном детектировали при помощи вторичных антител: кроличьих антител против целой молекулы мышинного IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена в рабочем разведении (Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in rabbit; Sigma, США) или козьих антител против целой молекулы крысиного IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Anti-Rat IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat, Sigma, США) соответственно.

Гибридизацию спленоцитов иммунных мышей проводили по стандартному протоколу [10]. В качестве партнера для слияния использовали мышиную миеломную клеточную линию X63-Ag8.653.

Спленоциты иммунных крыс сливали с клетками-партнерами мышинной миеломной линии Sp2/0-Ag14 (ATCC, США) в соотношении 2:1. Гибридизацию производили методом электрослияния на приборе BTX ECM2001 (Harvard Apparatus, США) по методике, описанной в статье [11].

Клетки полученных гибридом культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 20% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, GE Healthcare, США) и раствор гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco, Thermo Fisher, США).

Иммунотипирование МКА для выявления подтипов иммуноглобулинов проводили с использованием наборов полосок IsoQuick (ISOQ5 и ISOQ25) согласно протоколу, описанному в руководстве.

Выделение и очистка антител

Для получения крысиных МКА (R3, R8) гибридные клетки наращивали в 1 л ростовой среды, мышиное МКА (16D4) – в асцитах. Очистку проводили методом аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Великобритания). Выделенные иммуноглобулины переводили в 0,1М фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 («Эко-Сервис», Россия). Чистоту полученных иммуноглобулиновых фракций оценивали по результатам электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях по методу Лэммли с окраской геля кумасси R-250. После отмывки сканировали гель в аппарате Amersham Imager 680 (GE Healthcare, Швеция). Эффективность хроматографической очистки МКА анализировали с помощью программного обеспечения Bandscan5.0.

Анализ специфической активности МКА в иммуноферментном анализе

Для проверки специфической активности очищенных МКА проводили непрямой вариант ИФА. Для этого в тестовые лунки 96-луночных полистироловых планшетов, сенсibilизированных рекомбинантными Stx2A или Stx2B в концентрации 10 мкг/мл, вносили последовательные двукратные разведения МКА, начиная с 1 мкг/лунку в объеме 100 мкл. Вторичные антитела, указанные ранее, использовали в разведении 1:5000 и добавляли в объеме 100 мкл/лунку соответственно первичным антителам.

Реакцию проявляли с помощью готового субстрат-индикаторного раствора ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Amresco, США). Учет результатов проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм.

Специфичность МКА в иммуноблоттинге

Специфичность к субъединицам шигатоксинов и взаимодействие с фильтратом КЖ, содержащей нативный Stx2, штамма *E. coli* O181:H4, определяли методом иммунного блоттинга. Для этого антигены, а именно rStx2A и rStx2B (по 1 мкг/лунку), а также фильтрат КЖ, не содержащий Stx2, штамма *E. coli* ATCC 25922 (отрицательный контроль) разделяли по молекулярной массе, используя метод вертикального электрофореза в 12%-м ПААГ для rStx2A и в 15%-м ПААГ в буфере с трицином для rStx2B. Белки из геля переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью полусухой ячейки TransBlot SD SemiDry (Bio-Rad, США) по стандартному протоколу.

Свободные участки мембраны блокировали в 1%-м молоке. После отмывки мембраны инкубировали с МКА 16D4, 5G4, 5G8, R3 и R8 в разведении 1:250. После инкубирования мембраны трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05% твин-20 (ФСБ-Т), для удаления несвязавшихся антител. Вторичные антитела использовали те же, что указаны выше, также в разведении 1:5000. Инкубирование продолжалось 40 мин при комнатной температуре. После этого мембраны отмывали раствором ФСБ-Т не менее 6 раз. Для визуализации реакции в качестве субстрата использовали 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (Sigma, США).

Анализ специфической активности МКА к нативному шигатоксину с использованием иммунохемилюминесцентного анализа

Анализ специфической активности МКА к нативным шигатоксинам проводили с использованием фильтрата КЖ, содержащей нативный Stx2, штамма *E. coli* O181:H4. Для этого проводили электрофорез проб фильтрата КЖ, содержащей нативный шигатоксин (15 мкл/лунку) в 15%-м ПААГ. В качестве положительного контроля использовали раствор рекомбинантного белка (0,1 мкг на лунку), отрицательного – фильтрат КЖ, не содержащий Stx2, штамма *E. coli* ATCC 25922. Далее повторяли методику проведения иммуноблоттинга, описанную выше. Для обнаружения белка использовали хемилюминесцентный субстрат SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, США). Детекцию проводили по стандартному протоколу. Для визуализации изображения использовали прибор Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences, США).

Определение токсиннейтрализующей активности МКА против шигатоксина *in vitro*

Определение средней цитотоксической дозы (CD50) для фильтрата КЖ, содержащего нативный Stx2, штамма *E. coli* O181:H4 проводили по методике, которую использовали для исследования рекомбинантного белка [7]. Фильтраты КЖ, содержащие и не содержащие нативный Stx2, добавляли в лунки при их последовательных двукратных разведениях от 1/10 до 1/320.

Исследования токсиннейтрализующей активности МКА оценивали в МТТ-тесте. Для этого готовили культуральные планшеты с клеточной линией Vero в концентрации $2 \cdot 10^4$ клеток/лунку. Затем инкубировали фильтраты КЖ, содержащей нативный Stx2, в дозе 2 CD₅₀ со следующими МКА: 16D4; R3; R8; TMA-15; 5G8 и 5G4, в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе. Все МКА добавляли в концентрации 10 и 20 мкг/мл. После инкубации смесь фильтрат КЖ-МКА вносили по 100 мкл в лунки с клетками Vero. В качестве контролей использовали лунки без добавления КЖ, содержащей Stx2 (достигая 100% жизнеспособных клеток, контроль сравнения K1); лунки с добавлением мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) до конечной концентрации 0,024% (достигая 100% нежизнеспособных клеток, контроль сравнения K2). Далее культуральные планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе 72 ч. Через 72 ч инкубации в лунки добавляли по 10 мкл стокового раствора МТТ (до конечной концентрации 50 мкг/мл) и инкубировали еще 4 ч. Затем аккуратно отбирали культуральную среду с МТТ и лизировали клеточный слой добавлением 100 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США). Планшеты помещали на платформу шейкера TS-100C (BioSan, Латвия) и качали 30 мин 500 об./мин при комнатной температуре. Оптическую плотность клеточного лизата измеряли при длине волны 540 нм (ОП₅₄₀) на планшетном спектрофотометре xMark. Процент выживших клеток определяли по формуле:

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

где

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

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

K1 – контроль сравнения, 100% жизнеспособных клеток;

K2 – контроль сравнения, 100% нежизнеспособных клеток.

Определение токсиннейтрализующей активности МКА против шигатоксина *in vivo*

Фильтрат КЖ клинического штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 51658 использовали для внутрибрюшинного введения мышам. Белым аутбредным мышам (самцы/самки, 20–26 г) внутрибрюшинно вводили фильтрат КЖ, содержащий нативные Stx1 и Stx2, в количестве 2, 4 и 8 среднелетальных доз (LD₅₀), предварительно инкубированных совместно с МКА (200 мкг/мышь) в течение 30 мин при 37°C. В качестве контроля использовали соответствующие смеси без добавления антител. Уровень выживаемости определяли на 7-й день.

Результаты исследования

Характеристика моноклональных антител

С использованием гибридной технологии было получено три мышиных МКА (16D4, 5G4 и 5G8) и два крысиных МКА (R3 и R8) к Stx2A. Электрофоретический профиль очищенных с помощью аффинной хроматографии МКА отражал характерное наличие тяжелой (HC) и легкой (LC) цепей с молекулярной массой 50 и 25 кДа соответственно (рис. 1).

Чистота МКА после одностадийной очистки составила: для крысиных антител – 87,5%, для мышиных – 95–98%.

Результаты иммунотипирования показали, что все исследуемые антитела относятся к классу IgG, подклассу 1, легкая цепь у всех антител соответствовала изотипу κ (каппа).

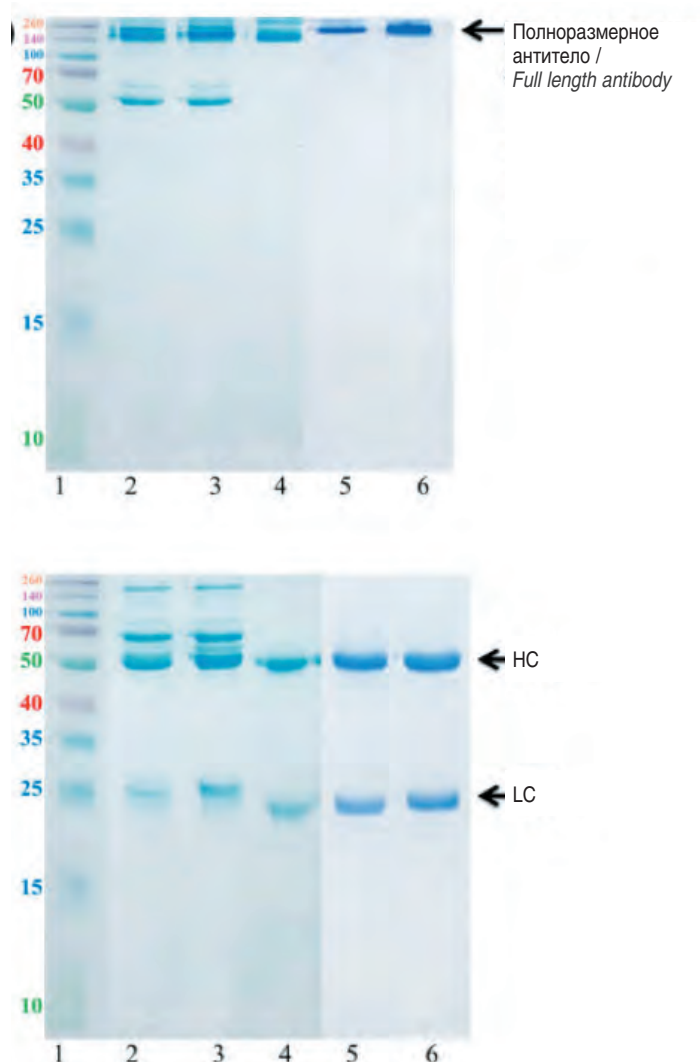


Рис. 1. Результаты электрофореза МКА после хроматографической очистки. Электрофорез МКА в 10%-м ПААГ: А) невосстанавливающие условия; Б) восстанавливающие условия. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; 2 – крысиное МКА R3; 3 – крысиное МКА R8; 4 – мышиное МКА 16D4; 5 – мышиное МКА 5G4; 6 – мышиное МКА 5G8.

Fig. 1. Results of electrophoresis of monoclonal antibodies after chromatographic purification. Electrophoresis of mAbs in 10% polyacrylamide gel: А) non-reducing conditions; Б) reducing conditions. Lanes: 1 – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder molecular weight marker; 2 – rat mAb R3; 3 – rat mAb R8; 4 – mouse mAb 16D4; 5 – mouse mAb 5G4; 6 – mouse mAb 5G8.

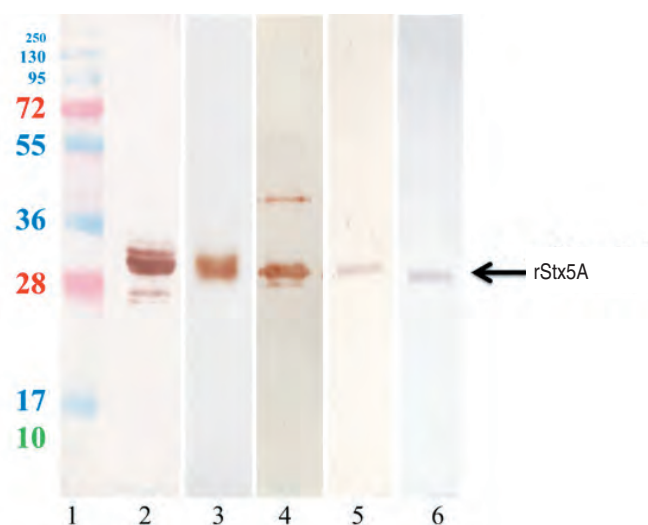


Рис. 2. Анализ специфичности МКА к рекомбинантному Stx2A. Электрофорез рекомбинантных Stx2A (2 мкг/лунку) в 12%-м ПААГ в восстанавливающих условиях по методу Лэммли с последующим иммуноблоттингом. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – МКА R3; 3 – МКА R8; 4 – МКА 16D4; 5 – МКА 5G4; 6 – МКА 5G8.

Fig. 2. Analysis of the mAbs specificity to recombinant Stx2A. Electrophoresis of recombinant Stx2A (2 µg/well) in 12% polyacrylamide gel under reducing conditions according to the Laemmli method followed by immunoblotting. Lanes: 1 – Molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – mAb R3; 3 – mAb R8; 4 – mAb 16D4; 5 – mAb 5G4; 6 – mAb 5G8.

Специфичность МКА

В ИФА МКА 5G4, 5G8, R3, R8 и 16D4 взаимодействовали с rStx2A и не взаимодействовали с rStx2B. Специфичность МКА к rStx2A была подтверждена с помощью иммуноблоттинга (рис. 2).

Методом иммунохемилюминесцентного анализа было обнаружено, что все исследуемые МКА взаимодействуют с белками фильтрата КЖ, содержащего нативный Stx2, и с rStx2A, но не взаимодействуют с rStx2B и ни с одним белком в отрицательном контроле. Полученные в результате визуализации сигнала изображения представлены на рис. 3.

Согласно рис. 3, МКА взаимодействовали с двумя белками на уровне 28 и 33 кДа в фильтратах КЖ, содержащих нативный Stx2. Проявление двух полос с молекулярной массой 28 и 33 кДа может быть результатом частичного разделения А-субъединицы (33 кДа) нативного Stx2 на два фрагмента с молекулярной массой: А1 – 28 кДа и А2 – 5 кДа, что наблюдается при воздействии клеточных ферментов – сериновых протеаз, накапливающихся в аппарате Гольджи. Фрагмент А2 не обнаруживается при визуализации сигнала, что может быть связано с низкой разрешающей способностью геля или отсутствием специфичности МКА к данному пептиду.

Токсиннейтрализующая активность МКА в тесте in vitro

Для определения токсиннейтрализующей активности в качестве активного шига токсина использовали фильтрат КЖ, содержащий нативный Stx2, в концентрации 2 CD₅₀. МКА добавляли в концентрации 10 и 20 мкг/мл. Результаты оценки токсиннейтрализующей активности МКА представлены в табл. 1.

Таблица 1. Нейтрализующая активность МКА в отношении Stx2 *in vitro*
Table 1. Neutralizing activity of mAbs against Stx2 *in vitro*

Добавление МКА / Adding mAbs		% живых клеток в присутствии Stx2 и МКА / % of living cells in the presence of Stx2 and mAbs					
		2 CD50 без МКА / 2 CD50 without mAbs	R3	R8	16D4	5G8	5G4
Концентрация / Concentration	10 мкг/мл / 10 µg/ml	0%	27%	35%	35%	29%	21%
	20 мкг/мл / 20 µg/ml	0%	51%	54%	53%	37%	31%

Обсуждение

Несмотря на более чем 40 лет исследований, на сегодняшний день отсутствуют одобренные препараты для специфического лечения STEC-инфекций, а применение антибиотиков считается неэффективным, так как в ряде случаев может ухудшить течение заболевания за счет увеличения образования и высвобождения бактериями токсинов [10]. Системное введение МКА, специфичных к Stx-белкам, считается перспективным подходом для профилактики или лечения вызванных действием шигатоксинов заболеваний, в первую очередь ГУС. В связи с этим разработка МКА, нейтрализующих шигатоксин, является актуальной задачей [3]. Мы провели исследование по получению МКА, способных нейтрализовать Stx2, который продуцируется ответственными за развитие ГУС штаммами STEC.

Нами были получены три мышиных МКА (16D4, 5G4 и 5G8) и два крысиных МКА (R3 и R8), специфических к А-субъединице шигатоксина 2-го типа. Мышиная модель получения МКА была выбрана как классическая и наиболее отработанная. Выбор крысиной модели для получения антител к rStx2A обусловлен более выраженной иммунологической реактивностью иммунной системы крыс на простые белковые антигены, а также большей стабильностью полученных гибридом [12].

Первичный скрининг гибридом проводили с использованием rStx2A и rStx2B. В результате было выявлено, что все полученные МКА взаимодействовали с rStx2A. Все анализи-

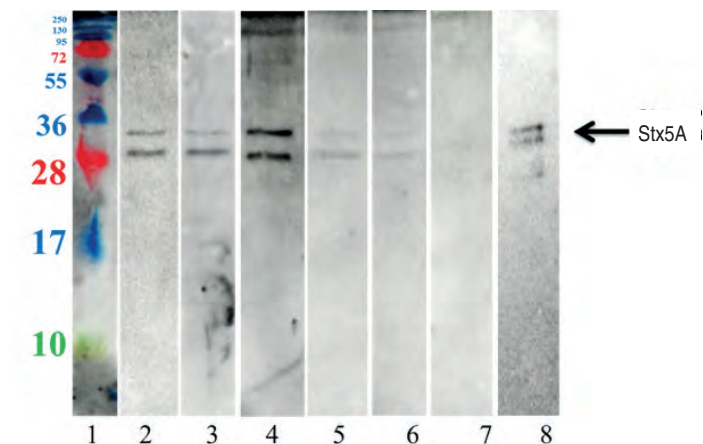


Рис. 3. Анализ специфичности МКА к нативному Stx2.

Взаимодействие МКА с белками фильтратов КЖ, содержащих нативный шигатоксин 2-го типа штамма *E. coli* O181:H4, иммунохемилюминесцентный анализ. Электрофорез в 15%-м ПААГ, в буфере с трицином. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – МКА R3; 3 – МКА R8; 4 – МКА 16D4; 5 – МКА 5G4; 6 – МКА 5G8; 7 – отрицательный контроль (КЖ *E. coli* O157:H7, не содержащая токсин); 8 – взаимодействие МКА R3 с рекомбинантной А-субъединицей Stx (0,1 мкг/лунку).

Fig. 3. Analysis of the specificity of mAbs to native Stx2.

Interaction of monoclonal antibodies with proteins of filtrates of culture fermentation broth containing native Shiga toxin type 2 of *E. coli* O181:H4, immunochemiluminescent assay. Electrophoresis in 15% PAGE, in buffer with tricine. Lanes: 1 – Molecular weight marker of protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – mAb R3; 3 – mAb R8; 4 – mAb 16D4; 5 – mAb 5G4; 6 – mAb 5G8; 7 – negative control (culture fermentation broth of *E. coli* O157:H7, not containing toxin); 8 – interaction of mAb R3 with recombinant A-subunit Stx (0.1 µg/well).

МКА 16D4; R3 и R8 в концентрации 20 мкг/мл нейтрализовали цитотоксическое действие Stx2 в отношении клеток линии Vero, защищая >50% клеток от гибели.

Токсиннейтрализующая активность МКА на мышиной модели

На основании результатов токсиннейтрализующей активности МКА в тесте *in vitro* для дальнейших исследований были отобраны 3 МКА: мышиное 16D4 и крысиные R3 и R8. Для выявления токсиннейтрализующей активности мышам вводили фильтрат КЖ, содержащей нативные Stx1 и Stx2, в количестве 2, 4 и 8 LD₅₀ совместно с МКА. Результаты выживаемости животных представлены в табл. 2.

МКА 16D4 защищало от гибели 83% мышей при введении им 2 LD₅₀ фильтрата КЖ, содержащей Stx2, 33% животных – при введении 4 LD₅₀, но не защищало от гибели при введении 8 LD₅₀. Введение МКА R3 и R8 совместно с 2, 4 или 8 LD₅₀ фильтрата КЖ, содержащей Stx2, не защищало полностью от гибели мышей. Однако во всех летальных случаях средние сроки гибели экспериментальных животных увеличивались.

Таблица 2. Оценка токсиннейтрализующей эффективности МКА на мышиной модели

Table 2. Evaluation of the toxin-neutralizing efficacy of mAbs in a mouse model

МКА / mAb	LD ₅₀	Выживаемость (выжило/пало) / Survivability (alive/dead)	Средние сроки гибели, сутки / Average time to death, days
16D4	2	5/1	5,0
	4	2/4	4,3
	8	0/6	4,0
R3	2	1/5	4,2
	4	0/6	4,0
	8	0/6	3,7
R8	2	1/5	3,6
	4	0/6	3,5
	8	0/6	3,3
Контроли / Controls	1	3/3	4,3
	2	0/6	4,0
	4	0/6	3,8
	8	0/6	3,2

руемые МКА относились к классу IgG, подклассу 1, легкая цепь у всех антител соответствовала изотипу κ.

Перед проведением анализа токсиннейтрализующей способности МКА важно было подтвердить специфичность полученных МКА к нативному шигатоксину 2-го типа подтипа Stx2a, синтезируемому клиническим изолятом *E. coli*. В связи с низким содержанием шигатоксинов в фильтрате культуральной жидкости для детекции Stx2 использовали высокочувствительный метод хемилюминесценции. Все полученные МКА взаимодействовали с нативным шигатоксином.

На первом этапе анализ токсиннейтрализующей активности антител проводили общепринятым тестом *in vitro* с использованием клеточной линии Vero. Было выявлено, что МКА 16D4, R3 и R8 нейтрализовали цитотоксическое действие Stx2 при внесении их в клеточную культуру Vero в концентрации 20 мкг/мл.

Дальнейшее подтверждение токсиннейтрализующей активности МКА проводили на мышинной модели. Результаты экспериментов показали, что только МКА 16D4 нейтрализовало токсическое действие фильтрата культуральной жидкости, содержащей Stx2. Введение МКА 16D4 совместно с 2, 4 или 8 LD₅₀ фильтрата культуральной жидкости, содержащей шигатоксин, способствовало снижению летальных исходов среди экспериментальных животных или увеличению средних сроков гибели мышей. При проведении экспериментов, связанных с выявлением токсиннейтрализующей активности МКА, в качестве источника Stx2 использовали не очищенный токсин, а фильтрат культуральной жидкости, который содержал другие токсичные компоненты, включая ЛПС и Stx1. Эти дополнительные компоненты также приводят к развитию патологий.

Таким образом, для получения наиболее полного представления о терапевтическом потенциале МКА необходимы дополнительные исследования.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение №075-15-2025-525 от 30.05.2025).

Financial support

The work was carried out with the financial support of a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No 075-15-2025-525 dated May 30, 2025).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Эмирова ХМ, Толстова ЕМ, Коган МЮ, Орлова ОМ, Абасеева ТЮ, Панкратенко ТЕ, и др. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шигатоксин-продуцирующей *Escherichia coli*. Нефрология. 2016;20(2):18-32.
2. Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. Toxins (Basel). 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345

3. Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-Rolfe A, Trachtman H. Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct; 17(4):926-41, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.926-941.2004
4. Melton-Celsa AR, O'Brien AD. New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2014 Oct;2(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0013-2013
5. Henrique IM, Sacerdoti F, Ferreira RL, Henrique C, Amaral MM, Piazza RMF, et al. Therapeutic Antibodies Against Shiga Toxins: Trends and Perspectives. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Feb 10; 12:825856. DOI: 10.3389/fcimb.2022.825856
6. Kirkland ME, Patfield S, Hughes AC, Hernlem B, He X. A novel Shiga toxin 2a neutralizing antibody therapeutic with low immunogenicity and high efficacy. Antimicrob Agents Chemother. 2024 Jan 10;68(1):e0059823. DOI: 10.1128/aac.00598-23
7. Шкуратова МА, Марьян МА, Погосин ММ, Калмантаева ОВ, Хлынцева АЕ, Сурин АК, и др. Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* при использовании различных алгоритмов получения целевого белка. Бактериология. 2024;9(3):8-19. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19
8. Kislichkina AA, Kartsev NN, Skryabin YP, Sizova AA, Kanashenko ME, Teymurazov MG, et al. Genomic Analysis of a Hybrid Enteroaggregative Hemorrhagic *Escherichia coli* O181:H4 Strain Causing Colitis with Hemolytic-Uremic Syndrome. Antibiotics (Basel). 2022 Oct 14;11(10):1416. DOI: 10.3390/antibiotics11101416
9. Kartsev NN, Detusheva EV, Kalmantaeva OV, Korobova OV, Gerasimov VN, Kombarova TI, et al. Hetero-Pathogenic O181:H4 EAHEC Strain of Sequence Type ST678 Associated with Hemolytic-Uremic Syndrome in Schoolchildren in Russia. Microorganisms. 2023 Jul 7;11(7):1771. DOI: 10.3390/microorganisms11071771
10. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
11. Зенинская НА, Рябоко АК, Марьян МА, Комбарова ТИ, Мицевич ИП, Ерусланов БВ, и др. Получение и характеристика крысиных моноклональных антител против антигена PAL *Legionella* spp. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022;40(2):14-20. DOI: 10.17116/molgen2022400214
12. Campbell A. Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology – The Production and Application of Rodent and Human Monoclonal Antibodies. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier; 1991. DOI: 10.1016/s0075-7535(08)70055-x

References

1. Emirova HM, Tolstova EM, Kogan MYu, Orlova OM, Abaseeva TYu, Pankratenko TE, et al. Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Nephrology. 2016;20(2):18-32. (In Russian).
2. Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. Toxins (Basel). 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345
3. Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-Rolfe A, Trachtman H. Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct; 17(4):926-41, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.926-941.2004
4. Melton-Celsa AR, O'Brien AD. New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2014 Oct;2(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0013-2013
5. Henrique IM, Sacerdoti F, Ferreira RL, Henrique C, Amaral MM, Piazza RMF, et al. Therapeutic Antibodies Against Shiga Toxins: Trends and Perspectives. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Feb 10; 12:825856. DOI: 10.3389/fcimb.2022.825856
6. Kirkland ME, Patfield S, Hughes AC, Hernlem B, He X. A novel Shiga toxin 2a neutralizing antibody therapeutic with low immunogenicity and high efficacy.

- Antimicrob Agents Chemother. 2024 Jan 10;68(1):e0059823. DOI: 10.1128/aac.00598-23
7. Shkuratova MA, Maryin MA, Rogozin MM, Kalmantaeva OV, Khlyntseva AE, Surin AK, et al. Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from *Escherichia coli* using various algorithms for producing the target protein. Bacteriology. 2024;9(3):8-19. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19 (In Russian).
8. Kislichkina AA, Kartsev NN, Skryabin YP, Sizova AA, Kanashenko ME, Teymurazov MG, et al. Genomic Analysis of a Hybrid Enterohemorrhagic Hemorrhagic *Escherichia coli* O181:H4 Strain Causing Colitis with Hemolytic-Uremic Syndrome. Antibiotics (Basel). 2022 Oct 14;11(10):1416. DOI: 10.3390/antibiotics11101416
9. Kartsev NN, Detusheva EV, Kalmantaeva OV, Korobova OV, Gerasimov VN, Kombarova TI, et al. Hetero-Pathogenic O181:H4 EAHEC Strain of Sequence Type ST678 Associated with Hemolytic-Uremic Syndrome in Schoolchildren in Russia. Microorganisms. 2023 Jul 7;11(7):1771. DOI: 10.3390/microorganisms11071771
10. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
11. Zeninskaya NA, Riabko AK, Marin MA, Kombarova TI, Mitsevich IP, Yeruslanov BV, et al. Obtaining and characterization of rat monoclonal antibodies against the antigen PAL *Legionella* spp. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2022;40(2):14-20. DOI: 10.17116/molgen20224002114 (In Russian).
12. Campbell A. Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology – The Production and Application of Rodent and Human Monoclonal Antibodies. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier; 1991. DOI: 10.1016/s0075-7535(08)70055-x

Информация о соавторах:

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

Зенинская Наталья Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

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

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

Ершова Анастасия Алексеевна, стажер-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

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

Светоч Эдуард Арсениевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

Olga V. Kalmantaeva, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Natalia A. Zeninskaya, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Anna E. Khlyntseva, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Nikolay N. Kartsev, PhD, MD, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

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

Anastasia A. Ershova, Research Intern of the laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

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

Alexander I. Borzilov, PhD, MD, Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Eduard A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Sciences), Professor, Chief Researcher of the Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

Характеристика качественного состава комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в перспективе использования его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета

С.Е.Гостищева, Н.В.Абзаева, Д.А.Ковалев, А.В.Костроминов, А.М.Жиров, Е.Л.Ракитина,
М.В.Костюченко, О.В.Логвиненко, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, М.А.Иванова, Т.М.Гридина

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Для оценки поствакцинального противочумного иммунитета используют клеточные тесты *in vitro* с применением проточной цитометрии, которая предусматривает использование различных комплексов растворимых антигенов в качестве специфических активаторов иммунных клеток.

Цель исследования. Изучить качественный состав комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для стандартизации свойств препарата и применения его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета методом проточной цитометрии.

В работе был изучен комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба на основе вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Спектрофотометрию всех серий образцов водного раствора осуществляли в 10 повторях на спектрофотометре NanoDrop 2000C. Исследование белкового состава проводили методом капиллярного электрофореза. Хроматографический анализ делали в обращенно-фазовом режиме с применением стандартных образцов моносахаридов, для каждой серии получали 5 хроматограмм. Количественное определение белков и нуклеиновых кислот проводили методом специфической флуориметрии. Для оценки поствакцинального противочумного иммунитета определяли экспрессию рецепторов (CD25) на поверхности лимфоцитов при антигенспецифической стимуляции *in vitro*.

Результаты и выводы. В ходе исследования препарата были получены характерные хроматографические профили, показавшие наличие полисахарида, мономерами которого являются глюкоза, рибоза и глюкозамин. Изучены спектры поглощения комплекса водорастворимого антигена, охарактеризован состав входящих в него белковых фракций. Показана стабильность характеристик препарата разных серий, что свидетельствует о стандартности технологического процесса получения и позволяет использовать его для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета в клеточных тестах *in vitro* в качестве специфического антигена при активации лимфоцитов.

Ключевые слова: комплекс водорастворимых антигенов, противочумный иммунитет, иммунизация, спектрофотометрия, проточная цитофлуориметрия, хроматографический анализ

Для цитирования: Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., Костроминов А.В., Жиров А.М., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Иванова М.А., Гридина Т.М. Характеристика качественного состава комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в перспективе использования его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета. Бактериология. 2025; 10(2): 15–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-15-21

Characteristic of the quality composition of the water-soluble antigen complex of the plague microbe. Prospects for using the water-soluble antigenic complex in evaluating the formation of post-vaccinal anti-plague immunity

S.E.Gostischeva, N.V.Abzaeva, D.A.Kovalev, A.V.Kostrominov, A.M.Zhirov, E.L.Rakitina,
M.V.Kostuchenko, O.V.Logvinenko, D.G.Ponomarenko, D.V.Rusanova, M.A.Ivanova, T.M.Gridina

Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

Для корреспонденции:

Гостищева Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Тел./факс: (8652) 33-52-30 доб. 347.

ORCID: 0000-0001-9891-3665

Статья поступила 31.10.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Svetlana E. Gostischeva, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of scientific and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation

Phone: (8652)33-52-30 add. 347

ORCID: 0000-0001-9891-3665

The article was received 31.10.2024, accepted for publication 30.06.2025

In vitro cellular tests using the flow cytometry method, in which different soluble antigen complexes are used as specific activators of immune cells are used to assess post-vaccinal plague immunity.

Objective of the research is studying the qualitative composition of the complex of water-soluble antigens of the plague microbe in order to standardise the properties of the preparation and to use it to assess the formation of post-vaccinal anti-plague immunity by flow cytometry. We studied the plague microbe water-soluble antigen complex based on the vaccine strain *Yersinia pestis* EV of the NIEG line. We performed spectrophotometry of all aqueous solution sample series in 10 repeats on a spectrophotometer using a NanoDrop 2000C. We investigated the protein composition by capillary electrophoresis. We performed reversed-phase chromatographic analysis using standard monosaccharide samples, and 5 chromatograms were obtained for each series. We performed reversed-phase chromatographic analysis using standard monosaccharide samples. We obtained 5 chromatograms for each series. We measured receptor (CD25) expression on the surface of lymphocytes during antigen-specific stimulation *in vitro* to assess post-vaccinal plague immunity.

Results and discussion. Our team analysed chromatographic profiles indicating the presence of a polysaccharide (the glucose as a monomer), ribose and glucosamine. We studied the absorption spectra of the water-soluble antigen complex and characterised the composition of the protein fractions. We confirmed the stability of the preparation of different series, which indicates the standardisation of the technological process. We studied the possibility of using it as a specific antigen during lymphocyte activation to assess the formation of post-vaccinal plague immunity in cellular tests *in vitro*.

Key words: water-soluble antigen complex, plague immunity, immunization, spectrophotometry, flow cytometry, chromatographic analysis

For citation: Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Kostrominov A.V., Zhirov A.M., Rakitina E.L., Kostuchenko M.V., Logvinenko O.V., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Ivanova M.A., Gridina T.M. Characteristic of the quality composition of the water-soluble antigen complex of the plague microbe. Prospects for using the water-soluble antigenic complex in evaluating the formation of post-vaccinal anti-plague immunity. Bacteriology. 2025; 10(2): 15–21. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-15-21

В России для специфической иммунопрофилактики чумы применяется вакцина чумная живая из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ отечественного производства, вызывающая формирование иммунного ответа длительностью до одного года. Вакцинация сопровождается выраженными изменениями иммунного статуса и затрагивает практически все звенья иммуногенеза [1, 2].

В развитии иммунного ответа на введение чумной вакцины участвуют три клеточные системы: макрофаги, Т- и В-лимфоциты, т.е. в формировании противочумного иммунитета клеточное звено является основным [3, 4].

В последние годы напряженность иммунитета и специфическая чувствительность к антигену все чаще оцениваются *in vitro* с использованием технологии проточно-цитометрического анализа [5, 6]. В данном методе для получения надежных и воспроизводимых результатов важно правильно подобрать специфические антигены для реакции и их дозировку, так как некоторые из них способны неспецифически взаимодействовать с лимфоцитами [7].

К уникальным свойствам антигенов можно отнести способность избирательно (специфически) связываться с лимфоцитами и активировать их. Активация лимфоцитов – сложный процесс перехода клетки из фазы G0 («фаза покоя») в фазу G1, который состоит из каскада реакций: активация фосфолипазы C, расщепляющей фосфатидилинозитолдифосфат на два медиатора – диацилглицерол и инозитолтрифосфат; увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке, способствующее активации различных ферментативных систем, что приводит к стимуляции синтеза РНК, белка и интерлейкина-2. Эти процессы завершаются экспрессией различных генов и их рецепторов на поверхности клетки. В ходе активационного (дифференцированного) механизма на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации.

В настоящее время наиболее полно изучены антигены чумного микроба: Caf1, «мышинный» токсин, липополисахарид, основной соматический антиген, активатор плазмидогена, мембранные белки. На их основе выпускаются различные диагностические препараты и тест-системы, а также

ведутся исследовательские работы по конструированию чумных вакцин нового поколения [8–13].

При всем многообразии способов извлечения специфических антигенов из микробных клеток необходим комплекс последовательных манипуляций, который позволил бы изолировать полноценные в антигенном отношении фракции для проведения исследований методом проточной цитометрии. Авторы остановили свой выбор на водно-солевых экстрактах, которые обладают сложным макромолекулярным составом и включают в себя большинство выявляемых у бактерий антигенов. Водорастворимый антиген изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией с последующей ультразвуковой дезинтеграцией и осаждением белковых фракций сульфатом аммония [14, 15]. Выход белковых фракций составлял не менее 5 мг/мл.

Полученный из биомассы чумного микроба водорастворимый антигенный комплекс (Чум-Аг) использовался в качестве специфического антигена при проведении исследований иммуногенной активности вакцины чумной живой методом проточной цитометрии. Было экспериментально показано, что комплекс обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro* и не вызывает неспецифических клеточных реакций у иммунных мышей. Изучение динамики интенсивности экспрессии маркеров ранней активации лимфоцитов показало возможность и перспективу применения полученного антигена для лабораторной оценки формирования поствакцинального иммунитета у вакцинированных на ранних сроках после вакцинации [16, 17].

Учитывая вышеизложенное, **цель** настоящей работы – изучить качественный состав комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для стандартизации свойств препарата и применения его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба, состоящий из трех фракций, получали на основе вакцинного

штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенного при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 ± 2 ч. Для обеззараживания полученной биомассы использовали охлажденный до $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ двойной объем ацетона, далее помещали в холодильник на 48 ± 2 ч при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и высушивали в вытяжном шкафу при температуре $22 \pm 4^\circ\text{C}$ в течение 12–18 ч.

Высушенную биомассу экстрагировали в 2,5%-м растворе хлорида натрия в холодильнике в течение 24 ± 2 ч, затем центрифугировали при $20\,000 \pm 200$ об./мин в течение 30 ± 5 мин. Получали надосадочную жидкость – антиген №1. Для получения второй фракции осадок, оставшийся после получения первой фракции, растворяли в 2,5%-м растворе натрия хлорида в соотношении 1:1 и помещали в ультразвуковой дезинтегратор, где разрушали при частоте 44 кГц в течение 30 ± 5 мин. Затем центрифугировали при $12\,000 \pm 500$ об./мин в течение 40 ± 5 мин. Получали надосадочную жидкость – антиген №2. Для получения третьей фракции осадок, оставшийся после получения второй фракции, экстрагировали в 2,5%-м растворе натрия хлорида в холодильнике в течение 24 ± 2 ч. Далее центрифугировали при $20\,000 \pm 200$ об./мин в течение 30 ± 5 мин. Получали надосадок – антиген №3. Полученные три порции водорастворимых антигенов (антигены №№ 1, 2 и 3) объединяли, помещали в вязкие мешки и проводили диализ против дистиллированной воды в холодильной камере при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ со сменой воды через 24 ± 4 ч в течение 48 ч. О завершении диализа судили по отсутствию в диализной воде солей натрия хлорида, которые определяли качественной реакцией с помощью 0,06 М раствора азотнокислого серебра. Проводили контроль специфической активности и специфичности антигена в реакции иммунодиффузии (РИД). Концентрацию белка Чум-Аг определяли согласно ОФС.1.2.3.0012.15 спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

Специфическая активность водорастворимого антигенно-го комплекса (Чум-Аг) составила 1:16. Специфичность – Чум-Аг не давал в РИД положительных результатов с гетерологичными сыворотками, т.е. зоны преципитата отсутствовали.

В работе использовали 7 экспериментальных серий полученного антигена.

Исследовали интактные водные растворы водорастворимых антигенов чумного микроба (1 мг/мл), кислотные гидролизаты и дериваты образцов. Для проведения анализов применялись реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США): дансил-гидразин, трифторуксусная кислота >99,00%, D-глюкоза, N-ацетил-D-галактозамин, D-галактозамин, D-рибоза, ацетонитрил >99,93%, ацетат аммония >98,00%, фосфатно-солевой буфер, pH 7,4.

Гидролиз проводили 2М трифторуксусной кислотой при температуре 99°C с последующим испарением кислоты при пониженном давлении и температуре 30°C [18]. Для дериватизации 9 мкл 1%-го раствора дансилгидразина в этаноле смешивали с 1 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера pH 7,4 и 10 мкл 10 мМ раствора моно/олигосахарида или гидролизата и инкубировали при 65°C в течение 20 мин [19].

Спектрофотометрию всех серий водного раствора антигенов осуществляли в 10 повторах при диапазоне 180–800 нм

на спектрофотометре NanoDrop 2000C (ThermoScientific, США).

Исследование белкового состава каждой серии препарата проводили методом капиллярного электрофореза на чипе для анализа ДНК с помощью автоматической системы Experion System (Bio-Rad, США). Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Experion Software, Version 3.2.

Хроматографический анализ делали в обращенно-фазовом режиме с применением стандартных образцов моносахаридов (D-рибоза, D-глюкоза, N-ацетил-D-галактозамин, D-галактозамин). Для каждой серии получали 5 хроматограмм. Использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (DionexCorp., США); колонка Reprosil-PurC18-Aq длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, и предколонка Acclaim® 120 C18 длиной 10 мм и внутренним диаметром 2 мм, размер частиц 5 мкм (Dr.Maisch, Германия). Регистрацию сигнала осуществляли с помощью флуоресцентного детектора FLD-3100 при длине волны возбуждения и эмиссии 336 и 530 нм соответственно. Элюирование вели в градиентном режиме с применением двух подвижных фаз. Фаза А – 0,1 М ацетат аммония в воде pH 6,8, фаза В – ацетонитрил. Градиент: 0–1 мин – 85% А; 1–8 мин – 85–60% А; 8–11 мин – 60% А; 11–12 мин – 60–85% А; 12–15 мин – 85% А. Скорость потока 1,0 мл/мин, объем вводимого образца 5 мкл, температура колонки 30°C . Формирование и обработку хроматограмм проводилось в программе Chromeleon v. 6.80 (DionexCorp., США).

Количественное определение белков и нуклеиновых кислот проводили методом специфической флуориметрии на приборе Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием наборов реактивов Qubitds DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США), Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, США) и Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen, США).

В качестве биомодели использовали белых лабораторных мышей: 4 группы по 30 особей в каждой. Иммунизировали экспериментальным препаратом «Вакцина чумная живая», полученным методом глубинного культивирования, в дозах – $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ живых микробных клеток (ж.м.к.) – подкожно в объеме 0,2 мл.

Кровь для исследования брали из сердца в объеме 1,0–1,5 мл до вакцинации у интактных животных (контрольная группа), а также на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации (у 6 животных из каждой группы). Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН.

Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов определяли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя количество CD45⁺CD3⁺CD25⁺-лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США). В качестве специфического антигена использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба. В контрольной пробе с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов клетки обрабатывали стерильным 0,9%-м изотоническим раствором натрия хлорида, pH 7,2. Натрий хлористый (ГОСТ 4233-77, хч, чда) служит для поддержания изотоничности среды и

окислительно-восстановительного потенциала, натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (ГОСТ 4172-76, чда) используется как регулятор кислотности и стабилизатор.

Учет результатов производили с помощью проточного цитометра FACS Calibur с программным обеспечением CellQuest Pro (Becton Dickinson, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных статистических программ: определяли среднее значение анализируемого показателя (M), ошибку средней арифметической (m). Достоверность уровня различий сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для каждой серии интактного образца комплекса водорастворимых антигенов были получены характерные спектры поглощения, которые содержали два максимума при 230 и 260 нм и локальный минимум при 232–238 нм, повторяющиеся от серии к серии (рис. 1). Все это указывает на соблюдение технологии и идентичность состава получаемых образцов.

Оценивая соотношения значений поглощений при 260/280 нм и 260/230 нм, можно судить о присутствии в анализируемых образцах белка и примесей нуклеиновых кислот. Значения их для раствора Чум-Аг составляют $A_{260/280}$ $1,6 \pm 0,05$ и $A_{260/230}$ $0,6 \pm 0,05$, что свидетельствует о большом количестве белка в образцах и подтверждается данными специфичной флуориметрии: концентрация белка – $0,216 \pm 0,00002$ мг/мл. Количество примесей нуклеиновых кислот по сравнению с белками незначительно и составляет: ДНК – $0,00441 \pm 0,00002$ мг/мл, РНК – $0,00328 \pm 0,00002$ мг/мл, что указывает на относительную чистоту получаемого образца. На наш взгляд, именно с этим связано отсутствие спонтанной активации лимфоцитов.

Состав белковых фракций препарата охарактеризовали на основании данных капиллярного электрофореза. Установлено, что исследуемые образцы включают белки в диапазоне молекулярных масс от 9 до 73 кДа. Выявлены основные фракции со средней молекулярной массой $9,11 \pm 0,25$; $14,71 \pm 0,07$; $23,58 \pm 0,05$ и $30,25 \pm 0,22$ кДа. Следует отметить, что наибольший вклад в содержание веществ белковой природы в образцах (до 38%) вносит фракция с наименьшей средней массой (~9 кДа). При исследовании водных растворов образцов, не содержащих восстановителя, электрофореграммы дополнительно включали пики слабой интенсивности с молекулярной массой >96 кДа, что связано с восстановлением дисульфидных связей в соответствующих высокомолекулярных белках в присутствии 2-меркаптоэтанола.

При высокоэффективной жидкостной хроматографии анализ образцов проводили с использованием флуоресцентной метки, поскольку детекция нативных углеводов оптическими методами имеет низкую чувствительность и недостаточную селективность вследствие отсутствия хромофорных групп. Введение флуоресцентных заместителей на функциональные группы молекул сахаров является одним из наиболее эффективных способов как повышения чув-

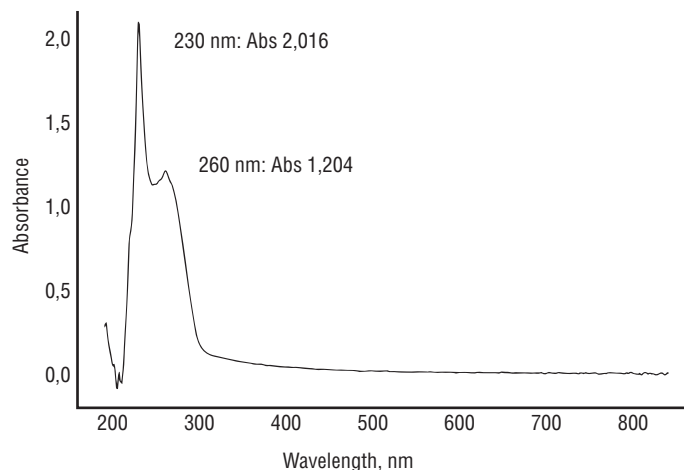


Рис. 1. Спектр УФ-поглощения водорастворимого антигена.
Fig. 1. UV absorption spectrum of water-soluble antigen.

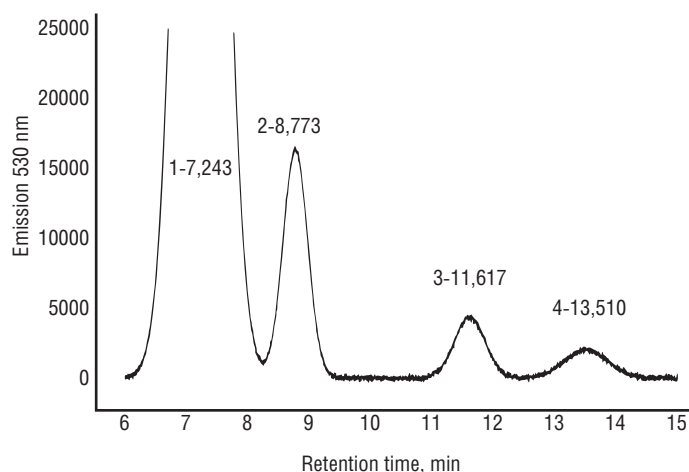


Рис. 2. Фрагмент хроматограммы водорастворимого антигена.
Fig. 2. The fragment of chromatogram of water-soluble antigen.

ствительности, так и одновременного улучшения селективности разделения.

Полученные хроматограммы образцов разных серий Чум-Аг показали идентичность полисахаридного состава и содержали общий пик с временем удерживания $8,77 \pm 0,13$ мин (рис. 2).

Данный пик принадлежит полисахаридам, входящим в белковый комплекс антигена. Этот вывод был сделан после получения пик-листов соответствующих гидролизатов. На хроматограммах присутствовали пик глюкозы (время удерживания $9,29 \pm 0,15$ мин) и минорные сигналы с большим временем удерживания ($12,66 \pm 0,1$ и $13,52 \pm 0,12$ мин), принадлежащие рибозе и глюкозамину (рис. 3).

Отсутствие пика с временем удерживания $8,77 \pm 0,13$ мин связано с гидролизом входящих в состав полисахаридов на соответствующие мономеры. При этом побочные продукты дериватизации элюировались через $7,22 \pm 0,02$ мин и $11,56 \pm 0,1$ мин на всех хроматограммах. Воспроизводимость хроматографических профилей образцов разных серий Чум-Аг составила $98,0 \pm 0,5\%$, что свидетельствует о стандартности технологического процесса и получаемых продуктов.

Таким образом, экспериментальные серии водорастворимого антигена были исследованы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что в состав полисахаридного комплекса входят глюкоза, рибоза

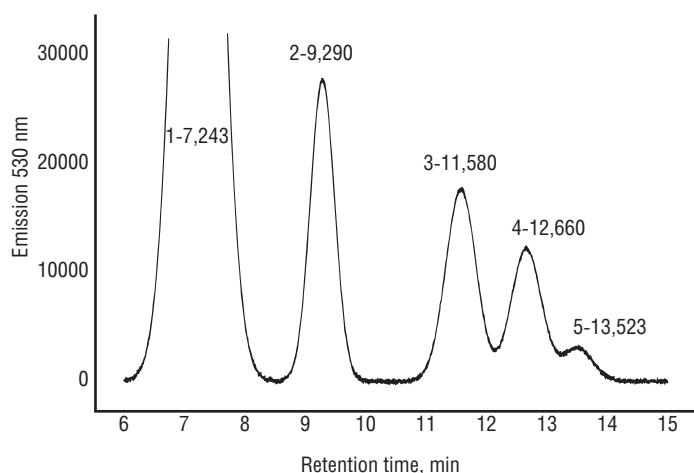


Рис. 3. Фрагмент гидролизованного водорастворимого антигена.
Fig. 3. The fragment of hydrolyzed water-soluble antigen.

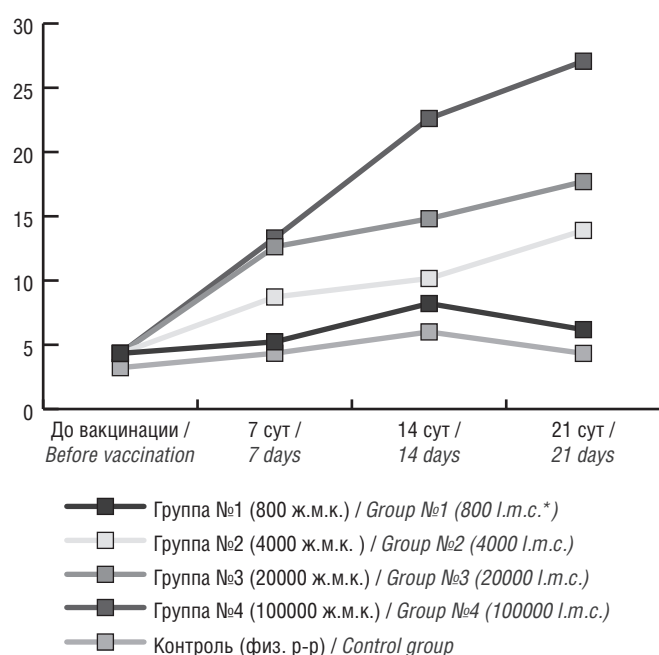


Рис. 4. Динамика количества специфически активированных лимфоцитов (CD25-позитивных) в крови у животных из групп сравнения.

Fig. 4. Dynamics of the number of specifically activated lymphocytes (CD25-positive) in the blood of animals from the comparison groups. (i.m.c.* – living microbial cells).

и глюкозамин. Описаны основные параметры спектров поглощения и состав белковых фракций комплекса водорастворимых антигенов. Показана стабильность характеристик всех полученных экспериментальных серий.

Стандартизация препарата по качественному составу основных показателей позволяет эффективно использовать его для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета в клеточных тестах *in vitro* в качестве специфического антигена при активации лимфоцитов.

На следующем этапе работы проведено исследование по оценке иммуногенной активности на белых мышах методом проточной цитометрии.

В ходе эксперимента у интактных животных (контрольная группа) количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации, при воздействии комплекса водорастворимых антигенов составило $4,33 \pm 0,48\%$, при воздействии 0,9%-м раствором натрия хлорида – $3,22 \pm 0,36\%$.

Во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано. У вакцинированных животных средний фоновый уровень количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации, при воздействии 0,9%-м раствором натрия хлорида на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации составил $5,19 \pm 1,04\%$ (рис. 4).

На 7, 14 и 21-е сутки у животных, иммунизированных дозой $8 \cdot 10^2$ ж.м.к., содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25, оставалось на уровне контрольных значений.

У мышей, иммунизированных дозой $4 \cdot 10^3$ ж.м.к., на 21-е сутки содержание лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации, после стимуляции антигеном повышалось и составляло $13,9 \pm 2,72\%$. Количество антигенстимулированных клеток у животных, иммунизированных дозой $2 \cdot 10^4$ ж.м.к., на 14-е сутки составляло $14,81 \pm 3,15\%$, на 21-е сутки – $17,7 \pm 0,93\%$.

При иммунизации дозой $1 \cdot 10^5$ ж.м.к. увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25 в условиях стимуляции водорастворимым антигеном, отмечалось на 7, 14 и 21-е сутки: до $13,31 \pm 2,3\%$; $22,61 \pm 1,62\%$ и $27,07 \pm 1,96\%$, что статистически выше контрольных значений ($p > 0,05$).

Анализ результатов исследования показал, что у животных групп №2, 3, 4 наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции *in vitro* регистрировался на 21-е сутки после иммунизации, при этом количество CD25-позитивных лимфоцитов было выше, чем в контрольной группе, на $9,57$ – $22,74\%$, что дает возможность судить об иммунном ответе в ранние сроки после вакцинации против чумы.

Выводы

В результате проведенных исследований показана возможность использования комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в качестве специфического активатора иммунных клеток при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета.

Полученные данные легли в основу оформления нормативной документации на «Антигенный водорастворимый комплекс из штамма *Yersinia pestis* EV лиофилизированный для клеточных тестов *in vitro* (Чум-Аг)» (Технические условия, Пусковой регламент, Инструкция по применению, проект маркировки первичной и вторичной упаковки).

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budget funding.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Кутырев ВВ, Бывалов АА. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011;2:97-104.
2. Фирстова ВВ, Дятлов ИА, Караулов АВ. Иммунологические аспекты чумы. Иммунология. 2016;37(1):61-63.
3. Литвинова ЛС, Гуцол АА, Сохоневич НА, Кофанова КА, Хазиахматова ОГ, Шуплецова ВВ, и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. Медицинская иммунология. 2014;1:7-29.
4. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. Hum Immunol. 2004 Apr;65(4):282-90. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.01.005
5. Богачева НВ, Крючков АВ, Дармов ИВ, Воробьев КА, Печенкин ДВ, Елагин ГД, и др. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;11:48-53.
6. Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(1):16-24. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-244
7. Киреев МН, Громова ОВ, Борисова СВ, Воробьева СА, Вольников ВР, Салихов РР, и др. Биотехнологический потенциал антигенов возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы, полученных в институте «Микроб». Проблемы особо опасных инфекций. 2024;(2):15-19. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19
8. Фирстова ВВ, Калмантаева ОВ, Горбатов АА, Кравченко ТБ, Тюрин ЕА, Бондаренко НЛ, и др. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей периодически вакцинирующихся против чумы. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015;3:62-68.
9. Дубровина ВИ, Корытов КМ, Пятидесятникова АБ, Киселева НО, Войткова ВВ, Брюхова ДД, и др. Опыт применения комплексного антигенного препарата чумного микроба для оценки выраженности специфического противочумного ответа. Acta Biomedica Scientifica. 2021;6(2):41-46. DOI: 10.29413/ABS.2021-6.2.4
10. Фирстова ВВ, Бахтеева ИВ, Титарева ГМ, Зырина ЕВ, Иванов СА, Киселева НВ, и др. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;1(103):56-59. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-56-59
11. Сомов АН, Дубровский АВ, Дунайцев ИА, Иванов СА, Комбарова И, Кочеткова ОЮ, и др. Иммуногенные свойства полиэлектролитных микрокапсул, нагруженных антигенами *Francisella tularensis* или *Yersinia pestis*. Иммунология. 2019;40(5):52-61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006
12. Уткин ДВ, Киреев МН, Гусева НР, Каплун ГА, Куклев ВЕ, Осина НА. Разработка биологического микрочипа для выявления антител к антигенам возбудителя чумы. Инфекция и иммунитет. 2019;9(2):393-398.
13. Девдариани ЗЛ, Терешкина НЕ, Тараненко ТМ, Киреев МН, Терехова ИВ, Григорьева ГВ, и др. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*). Проблемы особо опасных инфекций. 2013;1:74-77. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-74-77
14. Афанасьев ЕН, Тюменцева ИС, Коготкова ОИ, Ляпустина ЛВ, Жарникова ИВ, Савельева ИВ, и др. Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;103:67-69.
15. Афанасьев ЕН, Таран ИФ, Тюменцева ИС. Антигенная структура бруцелл. Сообщ. I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл. Ставрополь. 1986; 16 с. Деп. в ВНИИТИ, №6635-886.
16. Гостищева СЕ, Абзаева НВ, Ракитина ЕЛ, Пономаренко ДГ, Костюченко МВ, Логвиненко ОВ, и др. Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2019;1:50-54.
17. Гостищева СЕ, Абзаева НВ, Ракитина ЕЛ, Пономаренко ДГ, Костюченко МВ, Катунина ЛС, и др. Сравнительный анализ иммуногенной активности чумной вакцины в зависимости от среды выращивания. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;2:148-151. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151
18. Yuan X, Zeng Y, Nie K, Luo D, Wang Z. Extraction Optimization, Characterization and Bioactivities of a Major Polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0144773. DOI: 10.1371/journal.pone.0144773
19. Alpenfels WF. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1981 Jun;114(1):153-7. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90466-8

References

1. Kutyrev VV, Byvalov AA. The current state of the problem of improving the means of plague vaccination. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011;2:97-104. (In Russian).
2. Firstova VV, Dyatlov IA, Karaulov AV. Immunological aspects of the plague. Immunology. 2016;37(1):61-63. (In Russian).
3. Litvinova LS, Gutsol AA, Sokhnevich NA, Kofanova KA, Khaziakhmatova OG, Shupletsova VV, et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. Medical Immunology (Russia). 2014;16(1):7-26. DOI: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26 (In Russian).
4. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. Hum Immunol. 2004 Apr;65(4):282-90. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.01.005
5. Bogacheva NV, Kryuchkov AV, Darmov IV, Vorobiev KA, Petchenkin DV, Elagin GD, et al. Experimental evaluation using flow cytofluorometry level cell immunological memory in individuals vaccinated against plague and anthrax. Clinical Laboratory diagnostika. 2013;11:48-53. (In Russian).
6. Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of Flow Cytometry for Quality Evaluation of Biomedical Cell Products. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(1):16-24. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24 (In Russian).
7. Kireev MN, Gromova OV, Borisova SV, Vorob'eva SA, Vol'nikov VR, Salikhov RR, et al. Biotechnological Potential of Antigens of Plague, Cholera, Tularemia and Anthrax Pathogens, Obtained at the Russian Research Institute "Microbe". Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;(2):15-19. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19 (In Russian).
8. Firstova VV, Kalmantaeva OV, Gorbatoov AA, Kravchenko TB, Tyurin EA, Bondarenko NL, et al. Evaluation of specific humoral and cellular immunity in people periodically vaccinated against plague. Immunopathology, Allergology, Infectology. 2015;3:62-68. (In Russian).
9. Dubrovina VI, Korytov KM, Petyatetsnikova AB, Kiseleva NO, Voitkova VV, Bryukhova DD, et al. Experience of Using a Complex Antigenic Preparation of the Plague Microbe to Assess the Severity of a Specific Anti-Plague Response. Acta Biomedica Scientifica. 2021;6(2):41-46. DOI: 10.29413/ABS.2021-6.2.4 (In Russian).
10. Firstova VV, Bakhteeva IV, Titareva GM, Zyryna EV, Ivanov SA, Kisseleva NV, et al. Determination of the Expression of CD69 Marker of Early Activation in the Immune Mice Lymphocytes after their Stimulation with Plague Agent Antigens. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2010;1(103):56-59. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-56-59 (In Russian).
11. Somov AN, Dubrovsky AV, Dunaytsev IA, Ivanov SA, Kombarova TI, Kochetkova OYu, et al. Immunogenic properties of polyelectrolyte microcapsules loaded with

- Francisella tularensis* antigens or *Yersinia pestis*. Immunology. 2019;40(5):52-61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006 (In Russian).
12. Utkin DV, Kireev MN, Guseva NP, Kaplun GA, Kuklev VE, Osina NA. Development of a biological microchip for the detection of antibodies to antigens of the causative agent of plague. Infection and Immunity. 2019;9(2):393-398. (In Russian).
13. Devdariani ZL, Tereshkina NE, Taranenko TM, Kireev MN, Terekhova IV, Grigor'Eva GV, et al. Results of Modeling Experiments in Designing Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*). Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;1:74-77. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-74-77 (In Russian).
14. Afanasyev EN, Tyumentseva IS, Kogotkova OI, Lyapustina LV, Zharnikova IV, Savelieva IV, et al. Development of new approaches to the production of hyperimmune sera for the production of medical immunobiological preparations. Probl. osobo opasn. infek. 2010;103:67-69. (In Russian).
15. Afanasiev EN, Taran IF, Tyumentseva IS. Antigenic structure of *Brucella*. Messaging. I. Comparative evaluation of methods for the isolation of water-soluble antigens brutsell. Stavropol. 1986;16 P. Dep. VINITI, number 6635-B86. (In Russian).
16. Gostischeva SE, Abzaeva NV, Rakitina EL, Ponomarenko DG, Kostyuchenko MV, Logvinenko OV, et al. A promising approach to assessing the quality of live plague vaccine in terms of immunogenicity. Epidemiology and Vaccine Prevention. 2019;1:50-54. (In Russian).
17. Gostischeva SE, Abzaeva NV, Rakitina EL, Ponomarenko DG, Kostyuchenko MV, Katunina LS, et al. Comparative Analysis of the Immunogenic Activity of the Plague Vaccine Depending on the Growing Medium. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2021;2:148-151. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151 (In Russian).
18. Yuan X, Zeng Y, Nie K, Luo D, Wang Z. Extraction Optimization, Characterization and Bioactivities of a Major Polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0144773. DOI: 10.1371/journal.pone.0144773
19. Alpenfels WF. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1981 Jun;114(1):153-7. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90466-8
-
- Информация о соавторах:**
- Абзаева Наталья Вячеславовна, кандидат биологических наук, заведующая научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7418-9673
- Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9366-5647
- Костроминов Артём Валерьевич, научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-2228-5038
- Жиров Андрей Михайлович, научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7698-7361
- Ракитина Екатерина Львовна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6073-6544
- Костюченко Марина Владимировна, научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6068-6655
- Логвиненко Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, заведующая сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1054-8937
- Пономаренко Дмитрий Григорьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0422-6755
- Русанова Диана Владимировна, кандидат медицинских наук, заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-2229-6570
- Иванова Марина Алексеевна, лаборант-исследователь научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-9199-3885
- Гридина Татьяна Михайловна, научный сотрудник лаборатории биологического и технологического контроля ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
-
- Information about co-authors:**
- Natalia V. Abzaeva, PhD in Biological Sciences, head of the production laboratory of plague vaccine research and production, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7418-9673
- Dmitry A. Kovalev, PhD in Chemical Sciences, head of the laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9366-5647
- Artem V. Kostrominov, Researcher of the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-2228-5038
- Andrey M. Zhironov, Researcher at the Laboratory of Biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7698-7361
- Ekaterina L. Rakitina, PhD, MD, doctor of clinical laboratory diagnostics, sector of immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases, brucellosis laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6073-6544
- Marina V. Kostyuchenko, Researcher at the sector of immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases, brucellosis laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6068-6655
- Olga V. Logvinenko, PhD in Biological Sciences, head of sector of immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases, brucellosis laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1054-8937
- Dmitry G. Ponomarenko, PhD in Biological Sciences, head of the laboratory of brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0422-6755
- Diana V. Rusanova, PhD, MD, Head of the scientific and production laboratory of drugs for the diagnosis of especially dangerous and other infections, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-2229-6570
- Marina A. Ivanova, laboratory research assistant at the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-9199-3885
- Tatyana M. Gridina, Researcher at the laboratory of biological and technological control, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor

Характеристика генетической природы устойчивости *Vibrio cholerae* к теллурру

С.О.Водопьянов, А.В.Евтеев, М.И.Ежова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, В.Д.Кругликов

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

Изучена встречаемость генов резистентности к теллурру у представителей рода *Vibrio* и *Vibrio cholerae* при анализе данных GenBank и выборки из 1880 секвенированных геномов. В дополнение к первоначально идентифицированному в одном штамме *V. cholerae* гену *vc2323*, являющемуся гомологом гена резистентности к теллурру *tehA* *Escherichia coli*, идентифицирован второй ген устойчивости *vca0524*. Установлено, что оба гена резистентности присутствуют только у пяти из 155 типовых референтных представителей рода *Vibrio*. Данные протеомного анализа свидетельствуют, что функционально активными являются: протеин VC2323 (322 аминокислотных остатка), присутствующий в составе 1824 секвенированных геномов, и протеин VCA0524 (320 аминокислотных остатков), идентифицированный в 1736 геномах. Ряд штаммов несли трунктированные протеины VC2323 и VCA0524. Среди трунктированных протеинов в выборке секвенированных геномов в 51 структуре обнаружен вариант VCA0524 из 112 аминокислот, что явилось результатом делеции аденозина в позиции 266. Штаммы с делеционным VCA0524 относились к «классическому» биовару, циркулировали в период 1953–1999 гг. преимущественно в Индии. Последний случай выделения подобной культуры зарегистрирован в 1999 г. в России. Все штаммы с трунктированным *vca0524* несли «нормальный» ген *vc2323*. Компьютерное моделирование трехмерной структуры протеинов VC2323, VCA0524 показало, что они являются субъединицами, при этом три молекулы собираются в трансмембранную четвертичную структуру с центральным осевым каналом. Субъединицы трунктированного протеина VCA0524 из 112 аминокислот не способны к сборке в полноценную структуру. Признак устойчивости *V. cholerae* к теллурру, опосредуемый двумя генами *vc2323*, *vca0524*, можно рассматривать как видовой, что подтверждает ценность использования теллурита калия в практике лабораторной диагностики холеры как фактора элективности.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, теллур, тяжелые металлы, секвенирование, гены устойчивости

Для цитирования: Водопьянов С.О., Евтеев А.В., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Кругликов В.Д. Характеристика генетической природы устойчивости *Vibrio cholerae* к теллурру. Бактериология. 2025; 10(2): 22–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-22-27

Characterization of the genetic nature of *Vibrio cholerae* resistance to tellurium

S.O.Vodopyanov, A.V.Evteev, M.I.Yezhova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, V.D.Kruglikov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

The occurrence of tellurium resistance genes in representatives of the genus *Vibrio* and *Vibrio cholerae* was studied by analyzing GenBank data and a sample of 1,880 sequenced genomes. In addition to the *vc2323* gene originally identified in one *V. cholerae* strain, which is a homologue of the *tehA* *Escherichia coli* tellurium resistance gene, a second resistance gene *vca0524* has been identified. It was found that both resistance genes are present in only five out of 155 typical reference representatives of the genus *Vibrio*. Proteomic analysis data indicate that the functionally active proteins are VC2323 with a mass of 322 amino acids, present in 1824 sequenced genomes, and VCA0524 protein with a mass of 320 amino acids, identified in 1736 genomes. A number of strains carried trunked proteins VC2323 and VCA0524. Among the trunked proteins in the sample of sequenced genomes, a variant of VCA0524 with a mass of 112 amino acids was found in 51 cases, which was the result of deletion of adenosine at position 266. The strains with deletion VCA0524 belonged to the “classic” biovar, and circulated in the period 1953–1999 mainly in India. The last case of isolation of such a culture was registered in 1999 in Russia. All strains with trunked *vca0524* carried the “normal” *vc2323* gene. Computer modeling of the three-dimensional structure of VC2323 and VCA0524 proteins showed that they are subunits, three molecules are assembled into a transmembrane quaternary structure with a central axial channel. The 112-AC trunked VCA0524 protein subunits are not capable of assembling into a full-fledged structure. The sign of *V. cholerae* resistance to tellurium, mediated by two genes *vc2323*, *vca0524* can be considered as a species, which confirms the value of using potassium tellurite in the practice of laboratory diagnosis of cholera as an electivity factor.

Key words: *Vibrio cholerae*, tellurium, heavy metals, sequencing, resistance genes

For citation: Vodopyanov S.O., Evteev A.V., Yezhova M.I., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Kruglikov V.D. Characterization of the genetic nature of *Vibrio cholerae* resistance to tellurium. Bacteriology. 2025; 10(2): 22–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-22-27

Для корреспонденции:

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

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
ORCID: 0000-0003-4336-0439

Статья поступила 14.11.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher,
Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections,
Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
ORCID: 0000-0003-4336-0439

The article was received 14.11.2024, accepted for publication 30.06.2025

Теллур является тяжелым металлом, обладает высокой токсичностью и относится к веществам 1-го класса опасности (чрезвычайно опасные) [1]. Согласно гигиеническому нормативу, предельно допустимая концентрация теллура в воздухе рабочей зоны не может превышать 0,01 мг/м³ [2].

Высокая токсичность теллура в отношении ряда микроорганизмов обусловила его применение в микробиологии в виде растворимой соли теллурита калия. Установлено, что из числа патогенных бактерий к теллуриду калия устойчивы представители родов *Corynebacterium*, *Streptococcus faecalis*, *Listeria*, *Vibrio cholerae*, *Candida auris*. Питательные среды, содержащие теллурид калия, широко используются в качестве селективных при выделении микроорганизмов, обладающих устойчивостью к данному препарату [3–7].

Кластеры генов устойчивости к теллуру были идентифицированы у многих патогенных бактерий, включая клинические изоляты *Escherichia coli* [8–11]. Анализ растущего числа секвенированных микробных геномов выявил примечательную особенность ряда патогенных микроорганизмов – частую встречаемость устойчивости к теллуру. Недавно высказано предположение, что гены устойчивости к теллуру опосредуют функцию защиты патогенных микроорганизмов от последствий окислительного стресса [12].

Возбудитель холеры по сравнению со многими микроорганизмами устойчив к токсическому действию соединений теллура. Поэтому теллур в виде калиевой соли используют при работе с холерным вибрионом для конструирования диагностических сред [13–17] в качестве компонента транспортных сред и для подавления роста посторонней микрофлоры в процессе исследования [18].

Тем не менее, несмотря на многолетнее использование соединений теллура в практике лабораторной диагностики холеры и очевидные успехи в изучении генетической природы многих факторов и детерминант патогенности вибрионов, в настоящее время отсутствуют сведения о генетической природе устойчивости как *V. cholerae*, так и других представителей рода *Vibrio* к токсическому действию соединений теллура, хотя для других микроорганизмов подобная работа проводится [11, 19]. В настоящее время имеется единичное сообщение о нахождении в геноме одного штамма *V. cholerae* C6706 гена *vc2323*, детерминирующего образование гомолога протеина резистентности к теллуру *TehA*, выявленного у *E. coli* [20]. Сведения о наличии генов резистентности к теллуру в геномах других штаммов *V. cholerae* в доступной литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы заключалась в поиске и характеристике генов *V. cholerae*, детерминирующих устойчивость к теллуру, по результатам биоинформационного анализа коллекции секвенированных во ФКУЗ «Ростовский НИПЧИ» геномов *V. cholerae* и открытых баз данных.

Материалы и методы

Секвенирование проведено в ходе выполнения стратегической инициативы социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 года «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)». Используемая выборка была представ-

лена 1880 штаммами различных серогрупп и сроков выделения из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов». Необходимая информация о свойствах культур, месте и сроках их выделения получена из паспортов штаммов.

Для проведения полногеномного секвенирования библиотеку фрагментов ДНК получали с помощью набора реагентов Illumina Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Полученные ампликоны метили с использованием набора Nextera XT IndexKit (Illumina, США). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit. Сборка геномов осуществлялась при помощи программы Spades v. 3.15.4 [21]. Поиск генов проводился авторскими программами SeqAnalyzer 2.0 и Fragment Extractor 4.2.0, написанными на языке Java [22]. Определение аминокислотных замен проводили авторским скриптом, написанным на языке Python. Поиск генов резистентности к теллуру проводили в открытых базах данных BacMet [23] (<http://bacmet.biomedicine.gu.se>), NCBI, Pubmed. Анализ 3D структуры протеинов проводили с помощью web-ресурсов SWISS-model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive> и <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Электронный протеом (размер полипептидной цепи, изоэлектрическую точку, процент гидрофобных и заряженных аминокислот) изучали с помощью программы Fragment Extractor. Нуклеотидные последовательности репрезентативных геномов представителей семейства Vibrionaceae txid641 получили из NCBI.

Результаты исследования и их обсуждение

Поиск в базе данных BacMet, содержащей информацию о 470 экспериментально подтвержденных генах устойчивости к тяжелым металлам, а также о 25 477 генах потенциальной устойчивости [23], дал отрицательный результат – сведения о генах резистентности к теллуру у микроорганизмов рода *Vibrio* отсутствовали. Интересно отметить, что в базе BacMet содержалась информация всего о 10 генах резистентности к теллуру и отсутствовали сведения о генах устойчивости у заведомо резистентных микроорганизмов родов *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Candida*, что указывает на ее неполноту и необходимость разработки более полных баз данных.

Поэтому для дальнейшей работы мы проверили частоту встречаемости гена *vc2323*, гомолога гена *tehA* *E. coli*, детерминирующего устойчивость к теллуру, выявленного у штамма *V. cholerae* C6706 [20], в геномах вибрионов, входящих в состав различных баз данных. Проверка базы данных NCBI программой BLAST показала, что ген *vc2323* размером 969 н.п. находится в составе первой хромосомы холерного вибриона. По результатам анализа электронного протеома он детерминировал продукт из 322 аминокислот. Протеин VC2323 имел изоэлектрическую точку 9, доля гидрофобных и заряженных аминокислот составила 55 и 16,5% соответственно.

Второй ген, детерминирующий резистентность *V. cholerae* к соединениям теллура, первоначально был обнаружен в ходе поиска по доступным базам в составе второй хромосомы штамма *V. cholerae* RFB16 (CP043556.1, позиция

Таблица. Характеристика генов и продуктов, детерминирующих устойчивость к теллуру *vc2323* и *vca0524*, в репрезентативных геномах микроорганизмов рода *Vibrio*
Table. Characteristics of genes and products determining resistance to tellurium *vc2323* and *vca0524* in representative genomes of microorganisms of the genus *Vibrio*

Микроорганизм / Microorganism	Гены / Genes					
	<i>vc2323</i>			<i>vca0524</i>		
	% совпадения нуклеотидов / % nucleotide match	Число аминокислот / Number of amino acids	% совпадения аминокислотной последовательности / % amino acid sequence match	% совпадения нуклеотидов / % nucleotide match	Число аминокислот / Number of amino acids	% совпадения аминокислотной последовательности / % amino acid sequence match
<i>V. cholerae</i>	98,6	322	99,69	100	320	100
<i>V. mimicus</i>	88,6	322	95,2	81,4	320	93,6
<i>V. metoecus</i>	95	322	98,3	90,3	320	97
<i>V. tarrae</i>	97,5	322	99,69	91,6	320	97,8
<i>V. paracholerae</i>	97,1	322	99,69	97,8	320	98,4

1093482-1094444). Он кодировал протеин семейства TDT (Tellurite-Resistance/Dicarboxylate Transporter) и согласно принятой номенклатуре обозначен VCA0524. Выявленный ген резистентности имел размер 963 н.п., детерминировал протеин VCA0524 размером 320 аминокислот с изоэлектрической точкой 9,5, при этом доля гидрофобных и заряженных аминокислот составила 50,9 и 16,9% соответственно. При сравнительном изучении генов *vc2323* и *vca0524* между собой обнаружены различия: гомология нуклеотидной и аминокислотной структур составила всего 62 и 57% соответственно, что указывает на наличие у *V. cholerae* двух различных генов устойчивости к теллуру. Существование в одном штамме нескольких генов резистентности к теллуру показано у патогенных *E. coli* [24].

Для оценки встречаемости двух выявленных генов, детерминирующих резистентность к соединениям теллура, у микроорганизмов рода *Vibrio* был проведен поиск в базе данных репрезентативных геномов NCBI, содержащих информацию по 155 геномам вибрионов, входящих в род *Vibrio* (таблица).

Гены и их белковые продукты, детерминирующие устойчивость к теллуру, *vc2323* и *vca0524* обнаружены в геномах всего четырех из 155 референтных видовых штаммов: *V. mimicus* (ADAF01000003), *V. metoecus* (LBGP01000010), *V. tarrae* (QKKK01000040) и *V. paracholerae* (QKKR01000020). Во всех случаях белковый продукт имел такое же число аминокислот, как и протеин, выявленный в холерном вибрионе (таблица). У *V. mimicus* зарегистрированы различия в нуклеотидной последовательности и белковой последовательности генов *vc2323* (88,6 и 95,2%) и *vca0524* (81,4 и 93,6% соответственно). В случае трех других представителей рода *Vibrio* – *V. metoecus*, *V. tarrae*, *V. paracholerae* – для изучаемых генов отмечен высокий консерватизм нуклеотидной и белковой последовательности. Полученный результат указывает, что аналоги генов устойчивости к теллуру *vc2323* и *vca0524* не характерны для абсолютного большинства представителей рода *Vibrio*.

Протеины VC2323 и VCA0524 у пяти представителей рода *Vibrio* имели сходную изоэлектрическую точку, процент гидрофобных и заряженных аминокислот по сравнению со структурами в геноме холерного вибриона. На наш взгляд, это позволяет рассматривать протеины VC2323 и VCA0524

размером 322 и 320 аминокислот как функционально активные.

Следующим этапом исследования было установление встречаемости генов устойчивости к теллуру *vc2323* и *vca0524*, детерминирующих функционально активные протеины, в выборке секвенированных геномов *V. cholerae*.

Первоначально был проведен поиск по алгоритму BLAST в базе GenBank при глубине запроса 100 штаммов. Все геномы *V. cholerae* содержали гены *vc2323* длиной 969 н.п., детерминирующий протеин размером 322 аминокислоты, и *vca0524* размером 963 н.п., детерминирующий протеин размером 320 аминокислот. На наш взгляд, это позволяет рассматривать протеины VC2323 и VCA0524 размером 322 и 320 аминокислот для вида *V. cholerae* как функционально активные.

Протеин VC2323 массой 322 аминокислоты обладал крайне высоким консерватизмом, поскольку в 1824 секвенированных геномах (98%) показал более 96% совпадений нуклеотидной последовательности, при этом аминокислотная последовательность совпала на 98% и более. Однако в трех геномах ген *vc2323* размером 969 нуклеотидов имел мутационные изменения, приводящие к формированию трюнкированных белковых продуктов размером 149; 7; 272 аминокислот соответственно.

Несколько иную картину наблюдали в процессе анализа встречаемости гена *vca0524* и его продукта в выборке секвенированных геномов. «Полноценный» ген *vca0524* и его продукт размером 963 нуклеотида и 320 аминокислот обнаружен в составе 1736 геномов изученной выборки (92%). При этом у 53 геномов ген имел размер 962 нуклеотидов, что было обусловлено делеционными событиями. В 51 геноме обнаружена делеция аденозина в позиции 266, что приводило к формированию «трюнкированного» протеина массой 112 аминокислот. В двух случаях делеции приводили к продукции протеинов массой 18 и 317 аминокислот. Протеин VCA0524 обладал высоким консерватизмом, поскольку 1667 геномов обладали совпадением >97%. На наш взгляд, высококонсервативные видовые гены *vc2323* и *vca0524* могут служить потенциальными генетическими мишенями при детекции *V. cholerae* с помощью молекулярных методов детекции.

При анализе 51 генома с трюнкированным протеином VCA0524 массой 112 аминокислот установлено, что они

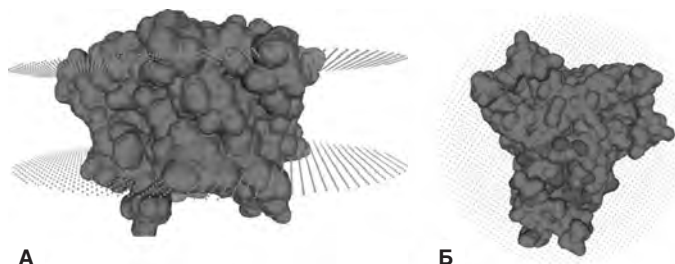


Рис. 1. Четвертичная структура протеина резистентности к теллuru, по данным 3D-моделирования, сформированная тремя субъединицами гена *vc2323* *V. cholerae*. Представлена схема сборки и локализации четвертичной структуры трансмембранного протеина, состоящего из трех субъединиц, в боковой (А) и вертикальной (Б) проекциях. В центре четвертичной структуры расположен осевой канал.

Fig. 1. The quaternary structure of the tellurium resistance protein, formed by three subunits of the *vc2323* gene of *V. cholerae*, according to 3D modeling. The assembly and localization scheme of the quaternary structure of the transmembrane protein, consisting of three subunits in the lateral (A) and vertical (B) projections, is presented. The axial channel is located in the center of the quaternary structure.

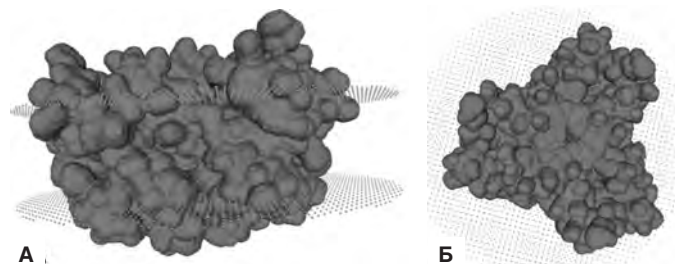


Рис. 2. Четвертичная структура протеина резистентности к теллuru, по данным 3D-моделирования, сформированная тремя субъединицами гена *vca0524* *V. cholerae*. Представлена схема сборки и локализации четвертичной структуры трансмембранного протеина, состоящего из трех субъединиц, в боковой (А) и вертикальной (Б) проекциях. В центре четвертичной структуры расположен осевой канал.

Fig. 2. The quaternary structure of the tellurium resistance protein, according to 3D modeling, formed by three subunits of the *V. cholerae vca0524* gene. The assembly and localization scheme of the quaternary structure of the transmembrane protein, consisting of three subunits in the lateral (A) and vertical (B) projections, is shown. The axial channel is located in the center of the quaternary structure.

представлены штаммами *V. cholerae* «классического» биовара, циркулировавшими в период 1953–1999 гг. преимущественно в Индии. Последний случай выделения подобной культуры зарегистрирован в 1999 г. в России. Все штаммы с труктурированным *vca0524* несли «нормальный» ген *vc2323*.

Столь высокая частота встречаемости двух генов резистентности к теллuru (*vc2323* и *vca0524*) у вида *V. cholerae* не удивительна, поскольку эмпирически установлена устойчивость холерных вибрионов к теллуриту калия [13]. Напротив, у *Salmonella enterica* подобный показатель встречаемости генов устойчивости к теллuru, по данным различных авторов, составил от 0,76 до 26% [11, 19], а у бактерий, выделенных из сточных вод очистных сооружений, частота выявления подобных генов составила всего 7% [25].

Проведенный с помощью web-ресурса SWISS-model анализ трехмерной структуры протеинов VC2323, VCA0524 показал, что они в условиях *in vivo* являются субъединицами для построения четвертичной структуры. Три субъединицы

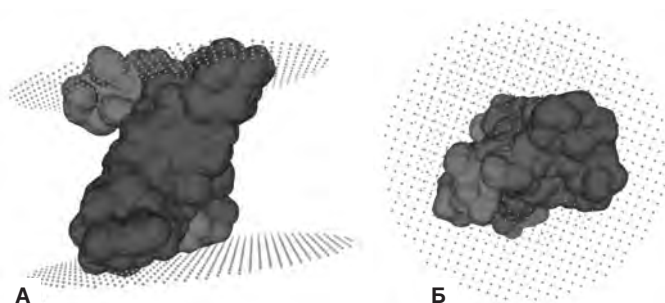


Рис. 3. Структура труктурированного протеина резистентности к теллuru VCA0524 *V. cholerae* размером 112 аминокислот по данным 3D-моделирования. Проекция сбоку (А) и сверху (Б). Сборка субъединиц в четвертичную структуру отсутствует.

Fig. 3. Structure of the 112-amino acid truncated tellurium resistance protein VCA0524 from *V. cholerae* according to 3D modeling. Side (A) and top (B) views. There is no assembly of subunits into a quaternary structure.

ницы протеинов VC2323, VCA0524, несмотря на различия в аминокислотном составе, способны к сборке в четвертичную трансмембранную структуру с центральным осевым каналом, вероятно, выполняющим функцию антипорта (рис. 1 а, б; рис. 2 а, б). Субъединицы труктурированного протеина VCA0524 размером 112 аминокислот не способны к сборке в четвертичную структуру (рис. 3). Полученные в ходе компьютерного трехмерного моделирования данные подтверждают наши предварительные выводы о полноценной биологической активности протеинов VC2323, VCA0524 и о ее отсутствии у мутантного протеина массой 112 аминокислот.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что абсолютное большинство изученных штаммов *V. cholerae* обладают как минимум двумя генами (*vc2323* и *vca0524*), локализованными в составе первой и второй хромосом и обуславливающими резистентность к бактерицидному действию теллuru. Аналоги двух генов резистентности были дополнительно обнаружены еще у четырех из 155 изученных представителей рода *Vibrio*. Выявленные гены детерминируют протеины VC2323 и VCA0524 размером 322 и 320 аминокислот, присутствующие у 98 и 92% из 1880 изученных геномов. При этом у 51 штамма классического биовара в гене *vca0524* обнаружена делеция одного нуклеотида, приводящая к формированию труктурированного протеина массой 112 аминокислот. По данным компьютерного моделирования, субъединицы протеинов VC2323 и VCA0524 собираются в трансмембранную четвертичную структуру с центральным осевым каналом. Делетированный протеин VCA0524 размером 112 аминокислот не способен формировать трехмерную структуру и поэтому, вероятно, утратил функциональную активность. Признак устойчивости *V. cholerae* к теллuru можно рассматривать как видовой, что подтверждает ценность широкого использования теллурита калия в практике лабораторной диагностики холеры как фактора селективности. Кроме того, высококонсервативные видоспецифические гены *vc2323* и *vca0524* можно рассматривать как потенциальные генетические мишени при разработке молекулярных методов детекции *V. cholerae*.

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. ГОСТ 17614-2018 Теллур технический: технические условия. М., 2018.
2. ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны». М., 2018.
3. Большая медицинская энциклопедия: [В 30-ти т./АМН СССР]. Гл. ред. Б.В. Петровский. 3-е изд. М.: Советская энциклопедия. Т. 24. С. 532
4. Медицинские иммунобиологические препараты. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. Методические указания МУ 3.3.2.2124-06.
5. Сагдуллаева ГУ, Мустафаева МИ. Изучение периода генерации листерий, выделенных из молока на питательных средах с теллуритом. Евразийский союз ученых. 2020;6-5(75):28-30. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.5.75.857
6. Патент №2788607 С 1 Российская Федерация, МПК C12N 1/16(2006.01). Способ получения питательной среды для селективного выявления *Candida auris*; №2022114795: заявл. 29.06.2022: опубл. 23.01.2023. Храмов МВ, Мицевич ИП. 24 с.
7. O'Brien M, Colwell R. Modified taurocholate-tellurite-gelatin agar for improved differentiation of *Vibrio* species. J Clin Microbiol. 1985 Dec;22(6):1011-3. DOI: 10.1128/jcm.22.6.1011-1013.1985
8. Taylor DE. Bacterial tellurite resistance. Trends Microbiol. 1999 Mar;7(3):111-5. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01454-7
9. Nguyen TTH, Kikuchi T, Tokunaga T, Iyoda S, Iguchi A. Diversity of the Tellurite Resistance Gene Operon in *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2021 May 28;12:681175. DOI: 10.3389/fmicb.2021.681175
10. Chasteen TG, Fuentes DE, Tantaleán JC, Vásquez CC. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. FEMS Microbiol Rev. 2009 Jul;33(4):820-32. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x
11. Souza SSR, Turcotte MR, Li J, Zhang X, Wolfe KL, Gao F, et al. Population analysis of heavy metal and biocide resistance genes in *Salmonella enterica* from human clinical cases in New Hampshire, United States. Front Microbiol. 2022 Oct 19;13:983083. DOI: 10.3389/fmicb.2022.983083
12. Vávrová S, Grones J, Šoltys K, Celec P, Turňa J. The tellurite resistance gene cluster of pathogenic bacteria and its effect on oxidative stress response. Folia Microbiol (Praha). 2024 Apr;69(2):433-444. DOI: 10.1007/s12223-024-01133-8
13. Gohar MA, Makkawi M. Potassium tellurite in the isolation of the cholera vibrio. J Egypt Med Assoc. 1947 Nov;30(11):556-61.
14. Лискина ИВ, Заболотная ОС. К вопросу проверки и оценки качества теллурита калия, применяемого для выделения холерного вибриона. Проблемы особо опасных инфекций. 1973;6:127.
15. Shimada T, Sakazaki R, Fujimura S, Niwano K, Mishina M, Takizawa K. A new selective, differential agar medium for isolation of *Vibrio cholerae* O1: PMT (polymyxin-mannose-tellurite) agar. Jpn J Med Sci Biol. 1990 Apr;43(2):37-41. DOI: 10.7883/yoken1952.43.37
16. Патент № 2484141 С1 Российская Федерация, C12Q 1/20(2006.01), C12Q 1/04(2006.01), C12R 1/01(2006.01). Элективно-дифференциальная питательная среда для выделения холерных вибрионов (варианты); №2012118446/10,

- 03.05.2012; опубл. 10.06.2013. Шелохович АИ, Мазрухо АБ, Харабаджян ГД, Терентьев АН, Черникова АА, Симаклова ДИ. 17 с.
17. Патент №5035399/13 Российская Федерация, C12Q 1/04(2006.01), C12N 1/00(2006.01). Способ выделения холерных вибрионов. RU 2039826. Малыгина ЗВ, Кокушкин АМ, Кологоров АИ, Салабуда МП.
18. Лабораторная диагностика холеры «МУК 4.2.3745-22. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы лабораторной диагностики холеры. Методические указания» (утв. Роспотребнадзором 12.05.2022).
19. Figueiredo R, Card RM, Nunez-Garcia J, Mendonça N, da Silva GJ, Anjum MF. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolated from Food Animal and Foodstuff May Also Be Less Susceptible to Heavy Metals. Foodborne Pathog Dis. 2019 Mar;16(3):166-172. DOI: 10.1089/fpd.2017.2418
20. Pei B, Wang Y, Katzianer DS, Wang H, Wu H, Zhong Z, et al. Role of a *TehA* homolog in *Vibrio cholerae* C6706 antibiotic resistance and intestinal colonization. Can J Microbiol. 2013 Feb;59(2):136-9. DOI: 10.1139/cjm-2012-0673
21. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
22. Водопьянов АС, Водопьянов СО, Писанов РВ, Олейников ИП, Иванов СА. SeqAnalyzer – программа для анализа результатов полногеномного секвенирования *Vibrio cholerae*, определения кратности варьируемых тандемных повторов (VNTR) и выявления INDEL-маркеров. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2017613695, РФ; 2016, 24 марта 2017 г.
23. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D737-43. DOI: 10.1093/nar/gkt1252
24. Valkovicova L, Vavrova SM, Mravec J, Grones J, Turňa J. Protein-protein association and cellular localization of four essential gene products encoded by tellurite resistance-conferring cluster "ter" from pathogenic *Escherichia coli*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013 Dec;104(6):899-911. DOI: 10.1007/s10482-013-0009-z
25. Zagui GS, Moreira NC, Santos DV, Darini ALC, Domingo JL, Segura-Muñoz SI, et al. High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: A new concern? Environ Res. 2021 May;196:110352. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110352

References

1. GOST 17614-2018 Tellur technical: technical conditions. M., 2018. (In Russian).
2. GN 2.2.5.3532-18 «Predel'no dopustimye kontsentratsii vrednykh veshchestv v vozdukh rabochei zony». M., 2018. (In Russian).
3. Bol'shaya meditsinskaya entsiklopediya: [V 30-ti t./AMN SSSR]. Gl. red. B.V. Petrovskiy.— 3-ye izd.—M.: Sovetskaya entsiklopediya. — T. 24. S. 532 (In Russian).
4. Meditsinskie immunobiologicheskie preparaty. Kontrol' diagnosticheskikh pitatel'nykh sred po biologicheskim pokazatelyam dlya vzbuditelei chumy, kholery, sibirskoi yazvy, tulyaremi, brutselleza, legionelleza. Metodicheskie ukazaniya MU 3.3.2.2124-06. (In Russian).
5. Sagdullaeva GU, Mustafayeva MI. Study of the period of generation of lysterias separated from milk on nutritional media with tellurite. Evraziiskii soyuz uchenykh. 2020;6-5(75):28-30. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.5.75.857 (In Russian).
6. Patent №2788607 S 1 Rossiiskaya Federatsiya, MPK C12N 1/16(2006.01). Sposob polucheniya pitatel'noi sredy dlya selektivnogo vyyavleniya *Candida auris*; №2022114795: zayavl. 29.06.2022: opubl. 23.01.2023. Khranov MV, Mitsevid IP. 24 s. (In Russian).
7. O'Brien M, Colwell R. Modified taurocholate-tellurite-gelatin agar for improved differentiation of *Vibrio* species. J Clin Microbiol. 1985 Dec;22(6):1011-3. DOI: 10.1128/jcm.22.6.1011-1013.1985

8. Taylor DE. Bacterial tellurite resistance. Trends Microbiol. 1999 Mar;7(3):111-5. DOI: 10.1016/S0966-842X(99)01454-7
9. Nguyen TTH, Kikuchi T, Tokunaga T, Iyoda S, Iguchi A. Diversity of the Tellurite Resistance Gene Operon in *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2021 May 28;12:681175. DOI: 10.3389/fmicb.2021.681175
10. Chasteen TG, Fuentes DE, Tantaleán JC, Vásquez CC. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. FEMS Microbiol Rev. 2009 Jul;33(4):820-32. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x
11. Souza SSR, Turcotte MR, Li J, Zhang X, Wolfe KL, Gao F, et al. Population analysis of heavy metal and biocide resistance genes in *Salmonella enterica* from human clinical cases in New Hampshire, United States. Front Microbiol. 2022 Oct 19;13:983083. DOI: 10.3389/fmicb.2022.983083
12. Vávrová S, Grones J, Šoltys K, Celec P, Turňa J. The tellurite resistance gene cluster of pathogenic bacteria and its effect on oxidative stress response. Folia Microbiol (Praha). 2024 Apr;69(2):433-444. DOI: 10.1007/s12223-024-01133-8
13. Gohar MA, Makkawi M. Potassium tellurite in the isolation of the cholera vibrio. J Egypt Med Assoc. 1947 Nov;30(11):556-61.
14. Liskina IV, Zabolotnaya OS. K voprosu proverki i otsenki kachestva tellurita kaliya, primenyaemogo dlya vydeleniya kholernogo vibriona. Problems of Particularly Dangerous Infections. 1973;6:127. (In Russian).
15. Shimada T, Sakazaki R, Fujimura S, Niwano K, Mishina M, Takizawa K. A new selective, differential agar medium for isolation of *Vibrio cholerae* O1: PMT (polymyxin-mannose-tellurite) agar. Jpn J Med Sci Biol. 1990 Apr;43(2):37-41. DOI: 10.7883/yoken1952.43.37
16. Patent №2484141 S1 Rossiiskaya Federatsiya, C12Q 1/20(2006.01), C12Q 1/04(2006.01), C12R 1/01(2006.01). Elektivno-differentsial'naya pitatel'naya sreda dlya vydeleniya kholernykh vibriov (varianty); №2012118446/10, 03.05.2012; opubl. 10.06.2013. Shelokhovitch AI, Mazrukho AB, Kharabadzhakhyan GD, Terent'ev AN, Chernikova AA, Simakova DI. 17 s. (In Russian).
17. Patent №5035399/13 Rossiiskaya Federatsiya, C12Q 1/04(2006.01), C12N 1/00(2006.01). Cposob vydeleniya kholernykh vibriov. RU 2039826. Malykhina ZV, Kokushkin AM, Kologorov AI, Salabuda MP. (In Russian).
18. Laboratornaya diagnostika kholery "MUK 4.2.3745-22. 4.2. Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Metody laboratornoi diagnostiki kholery. Metodicheskie ukazaniya" (utv. Rospotrebnadzorom 12.05.2022). (In Russian).
19. Figueiredo R, Card RM, Nunez-Garcia J, Mendonça N, da Silva GJ, Anjum MF. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolated from Food Animal and Foodstuff May Also Be Less Susceptible to Heavy Metals. Foodborne Pathog Dis. 2019 Mar;16(3):166-172. DOI: 10.1089/fpd.2017.2418
20. Pei B, Wang Y, Katzianer DS, Wang H, Wu H, Zhong Z, et al. Role of a *TehA* homolog in *Vibrio cholerae* C6706 antibiotic resistance and intestinal colonization. Can J Microbiol. 2013 Feb;59(2):136-9. DOI: 10.1139/cjm-2012-0673
21. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
22. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Pisanov RV, Oleinikov IP, Ivanov SA. SeqAnalyzer – programma dlya analiza rezul'tatov polnogenomnogo sekvenirovaniya *Vibrio cholerae*, opredeleniya kratnosti variabel'nykh tandemnykh povtorov (VNTR) i vyyavleniya INDEL-markerov. Svidetel'stvo o gosudarstvennoi registratsii programmy dlya EVM №2017613695, RF; 2016, 24 marta 2017 g. (In Russian).
23. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D737-43. DOI: 10.1093/nar/gkt1252
24. Valkovicova L, Vavrova SM, Mravec J, Grones J, Turna J. Protein-protein association and cellular localization of four essential gene products encoded by tellurite resistance-conferring cluster "ter" from pathogenic *Escherichia coli*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013 Dec;104(6):899-911. DOI: 10.1007/s10482-013-0009-z
25. Zagui GS, Moreira NC, Santos DV, Darini ALC, Domingo JL, Segura-Muñoz SI, et al. High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: A new concern? Environ Res. 2021 May;196:110352. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110352

Информация о соавторах:

Евтеев Артём Владимирович, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0087-9153

Ежова Мария Ивановна, научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-4254-3313

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

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

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, и.о. заведующего отделом микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-6540-2778

Information about co-authors:

Artem V. Evteev, Junior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0087-9153

Maria I. Ezhova, Researcher, Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-4254-3313

Aleksey S. Vodopyanov, PhD, MD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Acting Head of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, Acting Head of the Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-6540-2778

Оценка вибриоциногенной активности *ctx*⁺ и *ctx*⁻ штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы в планктонной форме и в составе биопленок

Е.А.Меньшикова, С.В.Титова, С.О.Водопьянов, Н.А.Селянская, Л.А.Егизарян, В.Д.Кругликов

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

На протяжении длительного периода эволюции микроорганизмы выработали множество факторов, позволяющих им выживать в конкурентной борьбе за существование. Многие бактерии синтезируют биологически активные вещества белково-пептидной природы, ингибирующие частично или полностью рост филогенетически близкородственных микроорганизмов и даже таксономически неродственных бактерий. Одним из таких веществ является бактериоцин-вибриоцин, продукция которого обеспечивает холерному вибриону селективное преимущество при смене места обитания: пребывание в инфицированном макроорганизме (в тонком кишечнике) с последующим существованием в природных экосистемах (гидробиоте). В работе использовали штаммы холерных вибрионов, выделенные от человека и из воды, а также штаммы из набора коллекции Фредерика и Чакрабарты. В результате проведенных исследований по изучению вибриоциногенной активности холерных вибрионов установлено, что культуры *Vibrio cholerae* в планктоне и биопленке в условиях, моделирующих весенне-летнюю температуру, независимо от наличия гена *ctx* обладали широким спектром вибриоциногенной активности и подавляли рост штаммов-индикаторов кишечной группы и *V. cholerae*. При температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ингибирующая активность исследуемых штаммов снижалась до умеренного и узкого спектра, однако даже в условиях, моделирующих зимний период, холерные вибрионы были способны подавлять рост возбудителей кишечной группы.

Ключевые слова: холерный вибрион, бактериоцин, вибриоцин, биопленка, планктон, спектр вибриоциногенной активности

Для цитирования: Меньшикова Е.А., Титова С.В., Водопьянов С.О., Селянская Н.А., Егизарян Л.А., Кругликов В.Д. Оценка вибриоциногенной активности *ctx*⁺ и *ctx*⁻ штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы в планктонной форме и в составе биопленок. Бактериология. 2025; 10(2): 28–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-28-32

Assessment of vibriocinogenic activity of *ctx*⁺ and *ctx*⁻ strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup in planktonic form and in biofilm composition

E.A.Menshikova, S.V.Titova, S.O.Vodopyanov, N.A.Selyanskaya, L.A.Egizaryan, V.D.Kruglikov

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

Over a long evolutionary period, microorganisms have developed numerous factors that enable them to survive in the competitive struggle for existence. Many bacteria synthesize biologically active substances of protein-peptide nature that partially or completely inhibit the growth of phylogenetically closely related microorganisms and even taxonomically unrelated bacteria. One such substance is bacteriocin-vibriocin, the production of which confers a selective advantage on *Vibrio cholerae* when changing habitat: transitioning from an infected macroorganism (the small intestine) to natural ecosystems (hydrobiota). This work used strains of *V. cholerae* isolated from humans and from water, as well as strains from the Frederick and Chakrabarti collection. Studies investigating the vibriocinogenic activity of *V. cholerae* established that cultures in plankton and biofilm under spring-summer temperature conditions, regardless of the presence of the *ctx* gene, exhibited a wide range of vibriocinogenic activity and suppressed the growth of indicator strains of the intestinal group and *V. cholerae*. At $6 \pm 1^\circ\text{C}$, the inhibitory activity of the studied strains decreased to a moderate level and narrow spectrum, however, even under conditions simulating the winter period, cholera vibrios were able to suppress the growth of intestinal pathogens.

Key words: *Vibrio cholerae*, bacteriocin, vibriocin, biofilm, plankton, spectrum of vibriocinogenic activity

For citation: Menshikova E.A., Titova S.V., Vodopyanov S.O., Selyanskaya N.A., Egizaryan L.A., Kruglikov V.D. Assessment of vibriocinogenic activity of *ctx*⁺ and *ctx*⁻ strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup in planktonic form and in biofilm composition. Bacteriology. 2025; 10(2): 28–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-28-32

Для корреспонденции:

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

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

Телефон: (863) 240-91-08

ORCID: 0000-0002-6003-4283

Статья поступила 14.11.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Elena A. Menshikova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

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

Phone: (863) 240-9108

ORCID: 0000-0002-6003-4283

The article was received 14.11.2024, accepted for publication 30.06.2025

Антагонистическая активность патогенных микроорганизмов является одним из свойств, обеспечивающих им селективные преимущества в микробных ассоциациях различных экосистем. На протяжении длительного периода эволюции микроорганизмы выработали множество факторов, позволяющих им выживать в конкурентной борьбе за существование в местах естественного обитания. Многие бактерии синтезируют биологически активные вещества белково-пептидной природы, ингибирующие частично или полностью рост филогенетически близкородственных микроорганизмов и даже таксономически неродственных бактерий. Эти вещества с весьма специфическим действием получили название бактериоцинов [1, 2].

Попадая в окружающую среду, холерный вибрион вступает во взаимоотношения со всеми компонентами этой системы и вынужден перестраивать работу клетки, что сопровождается синтезом биологически активных веществ и образованием новых связей, позволяющих адаптироваться к меняющимся условиям. Одним из таких веществ является бактериоцин-вибриоцин, продукция которого обеспечивает холерному вибриону селективное преимущество при смене места обитания: пребывание в инфицированном макроорганизме (в тонком кишечнике) с последующим существованием в природных экосистемах (гидробиоте) [3–5]. И.М.Бадаловой с соавт. (1987) была выявлена плазмида, детерминирующая признак образования вибриоцинов [6]. Однако сведения о вибриоциногенной активности холерных вибрионов были получены в планктонной форме, и нет данных об антагонистической активности возбудителя холеры в составе биопленок.

Целью работы явилась оценка вибриоциногенной (ингибирующей) активности *ctx⁺* и *ctx⁻* штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы в планктонной форме и в составе биопленок.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы холерных вибрионов, выделенные от человека (*V. cholerae* O1 El Tor 5879 (*ctx⁺*), *V. cholerae* O1 El Tor 21157 (*ctx⁺*)) и из воды (*V. cholerae* O1 El Tor 21152 (*ctx⁺*), *V. cholerae* O1 El Tor 20000 (*ctx⁻*)), а также 11 штаммов из набора индикаторных культур коллекции Фредерика и Чакрабарты: *Shigella sonnei* M2/2, *Shigella flexneri* 3840, *Sh. sonnei* 56, *Sh. sonnei* 1712, *Sh. flexneri* 13681, *Shigella dysenteriae* 13683, *Escherichia coli* 1, *E. coli* ф, *E. coli* K-1, *V. cholerae* O1 El Tor 1077 (24), *V. cholerae* O1 classical 541 (54). Штаммы культивировали в бульоне Мартена (pH 7,6 ± 0,1) и чашках Петри с 1,5%-м агаром Мартена (pH 7,6 ± 0,1).

Спектр ингибирующей (вибриоциногенной) активности холерных вибрионов в планктоне и биопленке определяли методом перекрестного посева штаммов продуцентов к набору индикаторных культур [7]. На край пластины агара наносили каплю культуры (планктонная форма) и, наклоня чашку, давали капле стечь посередине в виде полосы шириной 0,5–0,7 см. Хитиновые фрагменты с биопленкой отпечатывали на агаровых пластинах также в виде полосы шириной 0,5–0,7 см. Выросшие культуры подвергали «холодовому шоку», помещая их на 18 ч в холодильник. Через 18 ч полосу роста продуцента счищали краем предметного

стекла. Остатки культуры на агаре убивали парами хлороформа. Чашки со штаммами-продуцентами проветривали в течение 2 ч. Через 2 ч на агаровые пластины с продуцентами подсеивали индикаторные культуры и помещали при 37°C на 24 ч.

Оценивали вибриоциногенную активность исследуемых штаммов по количеству лизированных индикаторных культур по 4-балльной системе. Контролем вибриоциногенной активности служили бульонные культуры исследуемых штаммов. Получение биопленок холерных вибрионов проводили описанными ранее и запатентованными способами, где в качестве биотического субстрата использовали хитиновый экоскелет речного рака *Astacus astacus* [8]. Исследуемые штаммы инкубировали в речной автоклавированной воде с субстратом и без в течение 30 суток (период наблюдения) при температуре 25 ± 1°C (зрелая биопленка), а затем последовательно помещали пробы в условия, моделирующие весенне-летний (15 ± 1°C) и зимний периоды (6 ± 1°C) [9]. Ранее нами были определены сроки формирования холерными вибрионами биопленки на хитиновом панцире речного рака [10]. Эксперименты повторяли трехкратно с соблюдением требований биологической безопасности [11].

Статистическую обработку полученных результатов по наличию вибриоциногенной активности и отсутствию ее у штаммов холерных вибрионов к 11 штаммам индикаторной группы проводили с использованием методов LibreOffice Calc. Определение критерия согласия χ^2 Пирсона и изучение линейной корреляции для произвольных таблиц проводили на онлайн-калькуляторе [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Исходные (контрольные) штаммы холерных вибрионов обладали широким спектром вибриоциногенной активности и лизировали индикаторные штаммы, за исключением *V. cholerae* O1 classical 541 (54). В ходе исследования было установлено, что культивируемые при температуре 25 ± 1°C штаммы-продуценты в планктоне и биопленке, независимо от наличия гена *ctx* и источника выделения, лизировали штаммы-индикаторы кишечной группы и *V. cholerae* O1 El Tor 1077 (24), в то время как классический штамм возбудителя холеры *V. cholerae* O1 classical 541 (54) оказался устойчивым к вибриоциногенной активности штаммов-продуцентов (табл. 1). При этом рост индикаторных культур отсутствовал не только на полосе посева индикаторного штамма, но и за ее пределами.

При 15 ± 1°C токсигенные штаммы холерных вибрионов *V. cholerae* O1 El Tor №№ 21157, 21152 так же, как и при 25 ± 1°C, лизировали штаммы-индикаторы кишечной группы и *V. cholerae* O1 El Tor 1077 (24) (в биопленке и планктоне) и не ингибировали рост *V. cholerae* O1 classical 541 (54). У штамма *V. cholerae* O1 El Tor 5879 (*ctx⁺*) в планктонной форме снизилась ингибирующая активность в отношении штамма *E. coli* K-12. Рост штамма-индикатора отсутствовал только на полосе штамма-продуцента, тогда как в биопленке токсигенный штамм полностью подавил рост индикаторного штамма, выходя за полосу посева. У нетоксигенного водного штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000 наблюдалось снижение ингибирующей активности в планктоне и биопленке по отно-

Таблица 1. Оценка вибриоциногенной активности штаммов-продуцентов при температуре от 25 до 6 ± 1°C
 Table 1. Evaluation of vibriocinogenic activity of producer strains at temperatures from 25 to 6 ± 1°C

№ штамма продуцента / Producer strain number	Форма / Form	Т, °C	Штаммы индикаторы / Strains indicators										
			Sh. sonnei M2/2	Sh. flexneri 3840	Sh. sonnei 56	Sh. sonnei 1712	Sh. flexneri 13681	Sh. dysenteriae 13683	E. coli C1	E. coli φ	E. coli K-12	V. cholerae 1077 (24)	V. cholerae 541 (54)
V. cholerae El Tor ctx+ 5879	БП	25	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	БП	15	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	+++	#	—
	БП	6	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	—	—
	ПЛ		—	+	—	++	+	+	++	++	++	—	—
V. cholerae El Tor ctx+ 21157	БП	25	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	БП	15	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	БП	6	+++	+	++	++	++	++	++	++	++	—	—
	ПЛ		—	—	—	—	—	—	—	+	++	—	—
V. cholerae ctx+ 21152	БП	25	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	БП	15	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	БП	6	—	—	++	++	++	++	++	++	++	—	—
	ПЛ		—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
V. cholerae El Tor ctx 20000	БП	25	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	БП	15	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	+++	+++	—
	БП	6	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	—	—
	ПЛ		#	#	#	#	#	#	#	#	+++	—	—

БП – биопленка, ПЛ – планктон, # – широкий, +++ – умеренный, ++, + – узкий, «–» – отрицательный спектры ингибирующей активности. /
 БП – biofilm, ПЛ – plankton, # – wide, +++ – moderate, ++, + – narrow, “–” – negative spectrum of inhibitory activity.

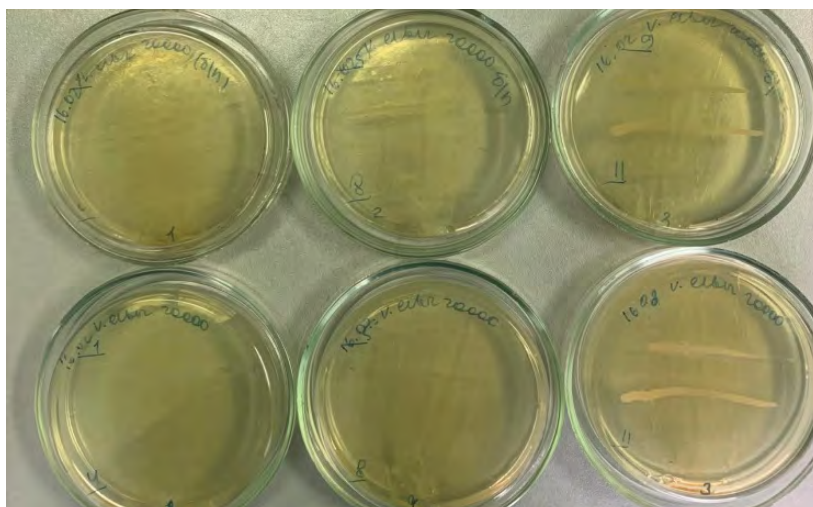
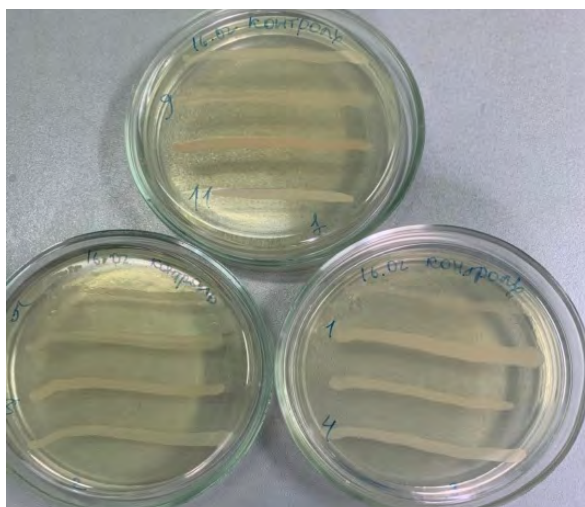


Рисунок. Спектр вибриоциногенной активности на примере штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000. Слева – контроль индикаторных штаммов, справа – вибриоциногенная активность штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000 в биопленке и планктоне (6 ± 1°C).
 Figure. Spectrum of vibriocinogenic activity using the example of the *V. cholerae* O1 El Tor 20000 strain. On the left is the control of indicator strains, on the right is the vibriocinogenic activity of the *V. cholerae* O1 El Tor 20000 strain in biofilm and plankton (6 ± 1°C).

Таблица 2. Статистическая оценка уровня значимости между биопленочными и планктонными пробами при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$

Table 2. Statistical assessment of the significance level between biofilm and planktonic samples at a temperature of $6 \pm 1^\circ\text{C}$

	Пробы с вибриоциногенной активностью (от ++ до #) / Samples with vibriocinogenic activity (from ++ to #)	Пробы с вибриоциногенной активностью (от – до +) / Samples with vibriocinogenic activity (from – to +)	Всего проб / Total samples
БП	33	11	44
ПЛ	14	30	44
Всего/ Total	47	41	88

БП – биопленочная форма; ПЛ – планктонная форма. / БП – biofilm form; ПЛ – planktonic form.

шению к штаммам *E. coli* K-12 и *V. cholerae* O1 El Tor 1077 (24). Штамм-продуцент подавлял рост штаммов индикаторов только на полосе роста (табл. 1).

В условиях, моделирующих температуру воды в зимний период на юге России ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), вибриоциногенная активность исследуемых штаммов снижалась. Возможно, это связано с замедлением обменных процессов или переходом части популяции холерных вибрионов в некультивируемое, но жизнеспособное состояние [13, 14], что, в свою очередь, приводило к снижению вибриоциногенной активности холерных вибрионов.

К действию вибриоцинов токсигенных штаммов (*V. cholerae* O1 El Tor №№ 5879, 21152 и 21157) в планктонной форме устойчивыми оказались от 2 до 9 штаммов-индикаторов. В составе биопленки эти же штаммы лизировали штаммы кишечной группы, но только на полосе роста продуцента. Нетоксигенный штамм *V. cholerae* O1 El Tor 20000, как в планктоне, так и в биопленке, частично подавлял рост микроорганизмов кишечной группы (на полосе штамма-продуцента наблюдали рост единичных колоний штаммов-индикаторов), а штаммы-индикаторы *V. cholerae* оказались устойчивы к его ингибирующему действию (табл. 1, рисунок).

С помощью критерия χ^2 Пирсона была оценена значимость различий между биопленочными и планктонными пробами по вибриоциногенной (ингибирующей) активности холерных вибрионов при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$, поскольку при температуре от 15 до $25 \pm 1^\circ\text{C}$ статистически значимых различий не выявлено. За ширину спектра принимали пробы, в которых вибриоциногенная активность составляла от «++» до «#». Результаты с «-» и «+» значениями учитывались как отрицательные (табл. 2).

В результате вычисления χ^2 Пирсона был равен 24,31, при числе степеней свободы $f = 1$, критическое (табличное) значение χ^2 Пирсона составило 3,841, что меньше опытного в нашем эксперименте ($24,31 \geq 3,841$). Статистический анализ показал, что вибриоциногенная активность штаммов холерных вибрионов в биопленке выше, чем в планктонной форме. Уровень значимости данной взаимосвязи соответствует $p < 0,05$.

Таким образом, в результате проведенных исследований по изучению вибриоциногенной активности холерных вибрионов установлено, что культуры *V. cholerae* в планктоне и

биопленке в условиях, моделирующих весенне-летнюю температуру, независимо от наличия гена *ctx* и источника выделения обладали широким спектром вибриоциногенной активности и подавляли рост штаммов-индикаторов кишечной группы и *V. cholerae*. При температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ингибирующая активность исследуемых штаммов снижалась до умеренного и узкого спектра, однако даже в условиях, моделирующих зимний период, холерные вибрионы были способны подавлять рост штаммов-индикаторов.

Взаимоотношения с различными представителями водной микробиоты в период циркуляции возбудителя холеры во внешней среде до настоящего времени изучены недостаточно. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят определить конкурентную способность холерных вибрионов как с гомологичными штаммами, так и с доминирующими видами микрофлоры поверхностных водоемов, поскольку антагонистическая активность является одним из факторов персистенции, обеспечивающих им селективные преимущества в микробных ассоциациях.

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

- Заславская МИ, Махрова ТВ, Александрова НА, Игнатова НИ, Белова ИВ, Точилина АГ, и др. Перспективы использования бактериоцинов нормальной микробиоты в антибактериальной терапии. Современные технологии в медицине. 2019;11(3):136-145. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.17
- Cui Y, Zhang C, Wang Y, Shi J, Zhang L, Ding Z, et al. Class Ila bacteriocins: diversity and new developments. Int J Mol Sci. 2012 Dec 6;13(12):16668-707. DOI: 10.3390/ijms131216668
- Бухарин ОВ, Перунова НБ, Долгушин ИИ. Микросимбиоз. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2015;4:12-16.
- Бухарин ОВ, Лобакова ЕС, Немцева НВ. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург, 2007;264.
- Курбатова ЕМ, Меньшикова ЕА. Некоторые факторы адаптации холерных вибрионов в составе водных экосистем. Ветеринарная патология. 2017;2(60):10-16.
- Бадалова ИМ, Мишанькин БН, Сучков ИЮ. Исследование генетической детерминированности признака вибриоциногенности у холерных вибрионов биотипа Эль-тор. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987;64(5):24-48.
- Иванова ЛВ, Воронежская ЛГ, Сомова АГ. Методические рекомендации по выявлению вибриоцинов холерных вибрионов O1 и неO1 сероваров. 1987;13.
- Водопьянов СО, Водопьянов АС, Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Титова СВ. Способ моделирования биопленок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Патент 2018: RU2662938C1.
- Температура воды в реке Дон [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pogoda1.ru/water/reka-don> 2023 (дата обращения 15.05.2024).
- Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Водопьянов СО, Писанов РВ, Титова СВ. Оценка способности холерных вибрионов формировать биопленку на

поверхности хитинового панциря речного рака. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(4):434-438. DOI: 10.36233/0372-9311-99

11. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Санитарные правила и нормы. СанПиН 3.3686-21. М., 2021.
12. Анализ произвольных таблиц (хи-квадрат) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html> (дата обращения 10.05.2025).
13. Соколенко АВ, Миронов АЮ. Некультивируемые формы *Vibrio cholerae* O1/O139. Национальные приоритеты России. 2014;3(13):86-89.
14. Меньшикова ЕА, Титова СВ, Водопьянов СО, Мелоян МГ, Селянская НА, Кругликов ВД. Влияние температуры на переход *Vibrio cholerae* O1 El Tor из биопленки в некультивируемое состояние. Бактериология. 2024;9(2):8-13. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-8-13

References

1. Zaslavskaya MI, Makhrova TV, Aleksandrova NA, Ignatova NI, Belova IV, Tochilina AG, et al. Prospects for Using Bacteriocins of Normal Microbiota in Antibacterial Therapy (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019;11(3):136-145. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.17 (In Russian).
2. Cui Y, Zhang C, Wang Y, Shi J, Zhang L, Ding Z, et al. Class Ila bacteriocins: diversity and new developments. *Int J Mol Sci*. 2012 Dec 6;13(12):16668-707. DOI: 10.3390/ijms131216668
3. Bukharin OV, Perunova NB, Dolgushin II. Mikrosimbioseno. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2015;4:12-16. (In Russian).
4. Bukharin OV, Lobakova ES, Nemtseva NV. Assotsiativnyi simbioz. *Ekaterinburg*, 2007;264. (In Russian).
5. Kurbatova EM, Men'shikova EA. Nekotorye faktory adaptatsii kholernykh vibriov v sostave vodnykh ekosistem. *Russian Journal of Veterinary Pathology*. 2017;2(60):10-16. (In Russian).
6. Badalova IM, Mishan'kin BN, Suchkov IYu. Issledovanie geneticheskoi determinirovannosti priznaka vibriotsinogenosti u kholernykh vibriov biotipa El'-tor. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1987;64(5):24-48. (In Russian).
7. Ivanova LV, Voronezhskaya LG, Somova AG. Metodicheskie rekomendatsii po vyavleniyu vibriotsinov kholernykh vibriov O1 i neO1 serovarov. 1987;13. (In Russian).
8. Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Men'shikova EA, Kurbatova EM, Titova SV. Sposob modelirovaniya bioplenok, formiruemykh *Vibrio cholerae* O1 serogruppy na poverkhnosti khitina. Patent 2018: RU2662938C1. (In Russian).
9. Temperatura vody v reke Don [Electronic resource]. Available at: <https://pogoda1.ru/water/reka-don> 2023. (accessed 15.05.24). (In Russian).
10. Menshikova EA, Kurbatova EM, Vodopyanov SO, Pisanov RV, Titova SV. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(4):434-438. DOI: 10.36233/0372-9311-99 (In Russian).

11. Sanitarно-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei. Sanitarnye privila i normy. SanPiN 3.3686-21. М., 2021. (In Russian).
12. Analiz proizvol'nykh tablits (khi-kvadrat) [Electronic resource]. Available at: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html> (accessed 10.05.2025). (In Russian).
13. Sokolenco AV, Mironov AYU. Uncultivable forms of *Vibrio cholerae* O1/O139: summary and outlook. *Natsional'nye prioritety Rossii*. 2014;3(13):86-89. (In Russian).
14. Menshikova EA, Titova SV, Vodopyanov SO, Meloyan MG, Selyanskaya NA, Kruglikov VD. Influence of temperature on the transition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from biofilm to the unculturable state. *Bacteriology*. 2024;9(2):8-13. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-8-13 (In Russian).

Информация о соавторах:

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7831-841X

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-4336-0439

Селянская Надежда Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0008-4705

Егизарян Лиана Альбертовна, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6350-065X

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-6540-2778

Information about co-authors:

Svetlana V. Titova, PhD, MD, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7831-841X

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, chief researcher of the of the department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-4336-0439

Nadezhda A. Selyanskaya, PhD, MD, senior researcher of the department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0008-4705

Liana A. Egizaryan, Junior Researcher of department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6350-065X

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-6540-2778

Секвенирование как метод новых технологий в диагностике особо опасных и природно-очаговых инфекций на современном этапе

Е.Е.Бжитских, А.А.Оплеухин, С.Б.Такысова, А.Ю.Югушев, Г.Х.Базарова, Е.Н.Рождественский, П.П.Санаров, Е.С.Полковников, А.В.Денисов, А.А.Киреев, Н.Ю.Красавина, И.Л.Григорьева, Н.В.Сапкаускас, Е.И.Филатов

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

Идентификация микроорганизмов является важной задачей для решения вопросов мониторинга природных очагов особо опасных инфекций, эпидемиологических расследований, геномной паспортизации и определения филогенетических связей штаммов микроорганизмов. Алтайской противочумной станцией в 2022–2023 гг. в результате внедрения в практику работы полногеномного секвенирования было проведено секвенирование выделенных в результате работы культур *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*. Полученные результаты позволили максимально точно типировать выделенные штаммы особо опасных и природно-очаговых инфекций и, таким образом, подтвердить результаты эпидемиологического расследования и выявить некоторые особенности циркуляции различных штаммов на территории природного очага чумы.

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, секвенирование, филогения

Для цитирования: Бжитских Е.Е., Оплеухин А.А., Такысова С.Б., Югушев А.Ю., Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н., Санаров П.П., Полковников Е.С., Денисов А.В., Киреев А.А., Красавина Н.Ю., Григорьева И.Л., Сапкаускас Н.В., Филатов Е.И. Секвенирование как метод новых технологий в диагностике особо опасных и природно-очаговых инфекций на современном этапе. Бактериология. 2025; 10(2): 33–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-33-37

Sequencing as a method of new technologies in the diagnosis of particularly dangerous infections and natural focal infections at the present stage

E.E.Bzhitskikh, A.A.Opleukhin, S.B.Takysova, A.Yu.Yugushev, G.Kh.Bazarova, E.N.Rozhdestvensky, P.P.Sanarov, E.S.Polkovnikov, A.V.Denisov, A.A.Kireev, N.Yu.Krasavina, I.L.Grigorieva, N.V.Sapkauskas, E.I.Filatov

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

The identification of microorganisms is an important task for addressing issues related to monitoring natural foci of infectious diseases, conducting epidemiological investigations, genomic certification, and determining the phylogenetic relationships of microorganism strains. The Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор introduced the practice of whole-genome sequencing in 2022–2023. This led to the sequencing of cultures of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. The results obtained allowed for the most accurate typing of isolated strains of particularly dangerous infections and natural focal infections, thus confirming the results of epidemiological investigations and identifying some features of the circulation of various strains within the territory of the natural plague focus.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, sequencing, phylogeny

For citation: Bzhitskikh E.E., Opleukhin A.A., Takysova S.B., Yugushev A.Yu., Bazarova G.Kh., Rozhdestvensky E.N., Sanarov P.P., Polkovnikov E.S., Denisov A.V., Kireev A.A., Krasavina N.Yu., Grigorieva I.L., Sapkauskas N.V., Filatov E.I. Sequencing as a method of new technologies in the diagnosis of particularly dangerous infections and natural focal infections at the present stage. Bacteriology. 2025; 10(2): 33–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-33-37

Для корреспонденции:

Оплеухин Алексей Александрович, кандидат биологических наук, биолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 06.06.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Aleksey A. Opleukhin, PhD in Biological Sciences, biologist of the bacteriological laboratory of the Federal State Institution of Health "Altai Anti-Plague Station" of Rosпотребнадзор

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

The article was received 06.06.2025, accepted for publication 30.06.2025

Идентификация микроорганизмов и определение филогенетических связей между ними являются крайне важными задачами для достижения таких целей, как мониторинг природных очагов особо опасных инфекций (ООИ), эпидемиологические расследования, геномная паспортизация.

В случае возникновения вспышек ООИ большое значение имеют как своевременная диагностика, так и определение конкретного штамма патогена в целях установления источника заражения и реализации необходимых мер защиты, а также устранения опасности дальнейшего распространения инфекции и лечения зараженных людей. Сходные цели стоят и при эпизоотическом обследовании природного очага инфекции: установление источника и масштаба эпизоотии и устранение опасности дальнейшего распространения инфекции и заражения людей.

Наиболее важными показателями метода диагностики является его высокая дифференцирующая способность, позволяющая различать все исследуемые изоляты, высокая скорость получения результата, воспроизводимость, простота в исполнении и интерпретации, низкая себестоимость. Несомненно важны также возможность сопоставления результатов, получаемых разными лабораториями, наличие общедоступных баз данных и международной номенклатуры [1–4]. Долгое время использование полногеномного секвенирования (как наиболее мощного метода дифференциации) в данном контексте встречало проблемы вследствие

его высокой стоимости и сложности проведения. Однако в результате совершенствования технологий и прихода в широкую лабораторную практику сначала технологий NGS (Next-Generation Sequencing), а затем и технологий секвенирования третьего поколения эти сложности при использовании удалось существенно снизить, и в настоящее время возросшая доступность секвенирования позволяет использовать этот метод в практических учреждениях, в т.ч. противочумных станциях.

При внедрении в практику работы Алтайской противочумной станции полногеномного секвенирования стоял вопрос определения значения увеличения точности идентификации при использовании метода для решения практических задач, таких как эпидемиологические расследования и обследования природных очагов инфекций, учитывая по-прежнему сравнительно высокую стоимость и трудозатратность метода по сравнению с методами, традиционно применяемыми в практических учреждениях. Это и стало целью данного исследования.

Материалы и методы

В 2022 г. Алтайской противочумной станцией было проведено секвенирование изолятов особо опасных и природно-очаговых инфекций. Образцы *Yersinia enterocolitica* получены в ходе эпидемиологического расследования, а *Yersinia pestis* – в рамках мониторинга очагов ООИ.

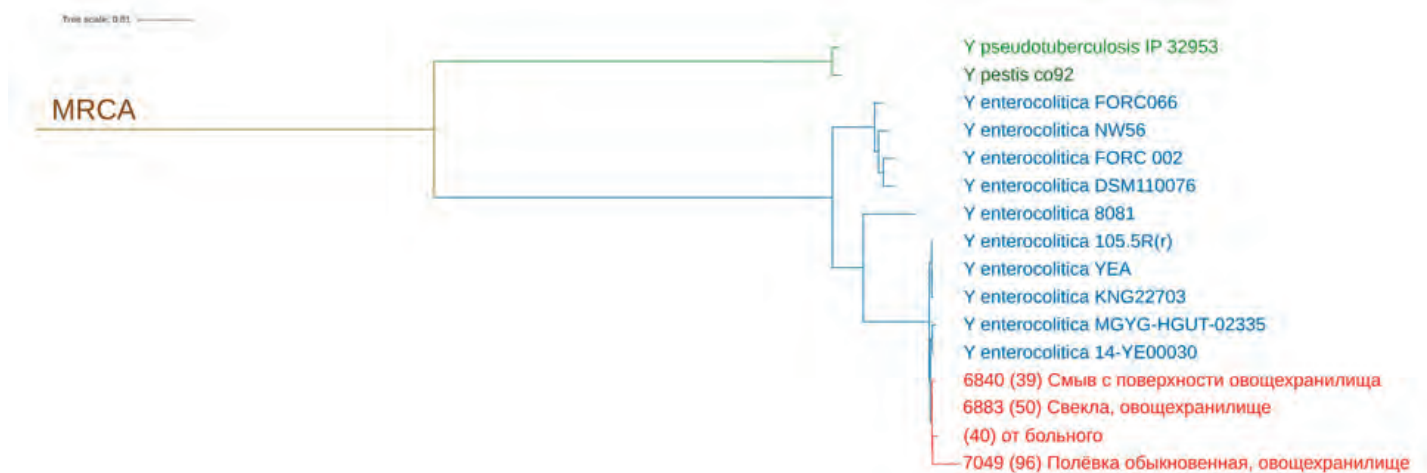


Рис. 1. Филогенетическое дерево выделенных штаммов *Y. enterocolitica*.
 Fig. 1. Phylogenetic tree of isolated *Y. enterocolitica* strains.

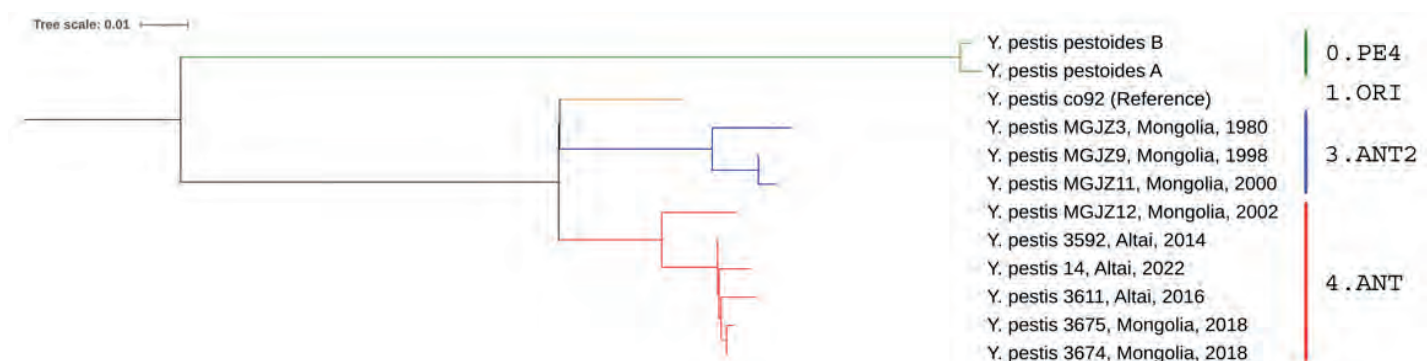


Рис. 2. Филогенетическое дерево выделенного штамма *Y. pestis* (2022 г.).
 Fig. 2. Phylogenetic tree of the isolated strain of *Y. pestis* (2022).

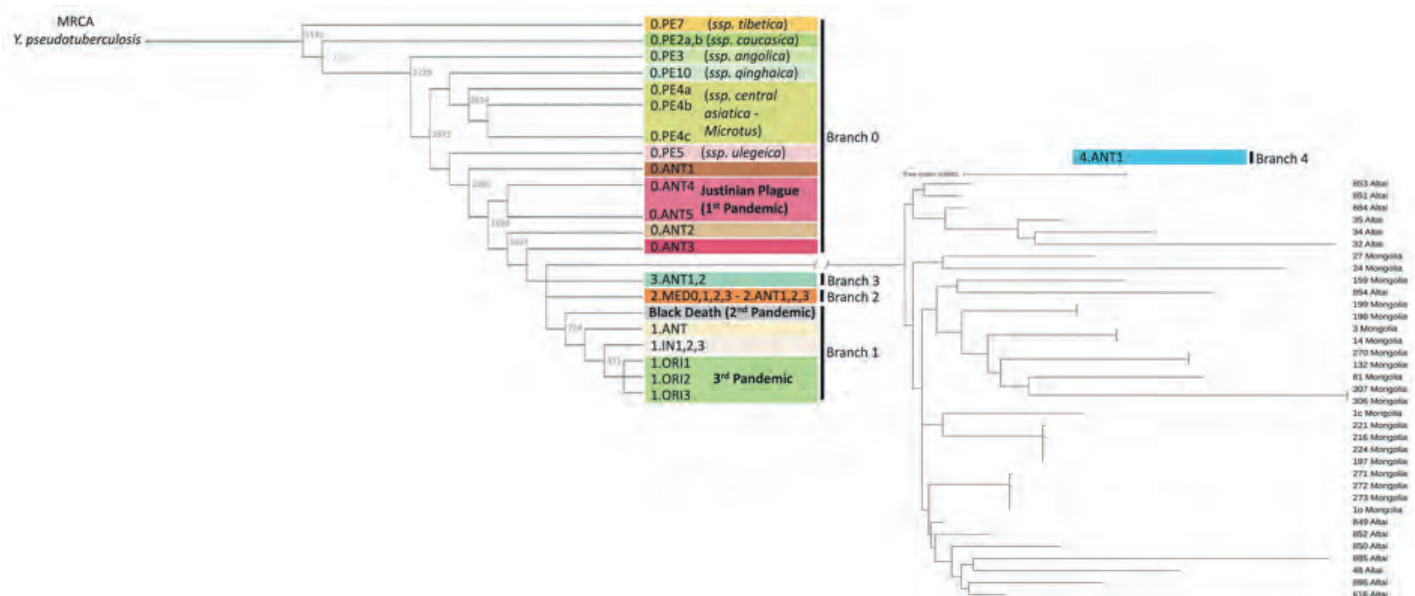


Рис. 3. Филогенетическое дерево выделенных в 2023 г. штаммов *Y. pestis*. Деревья дивергенции филогенетических групп [14] и выделенных штаммов имеют разный масштаб дистанций.

Fig. 3. Phylogenetic tree of *Y. pestis* strains isolated in 2023. The divergence tree of phylogenetic groups [14] and isolated strains have different distance scales.

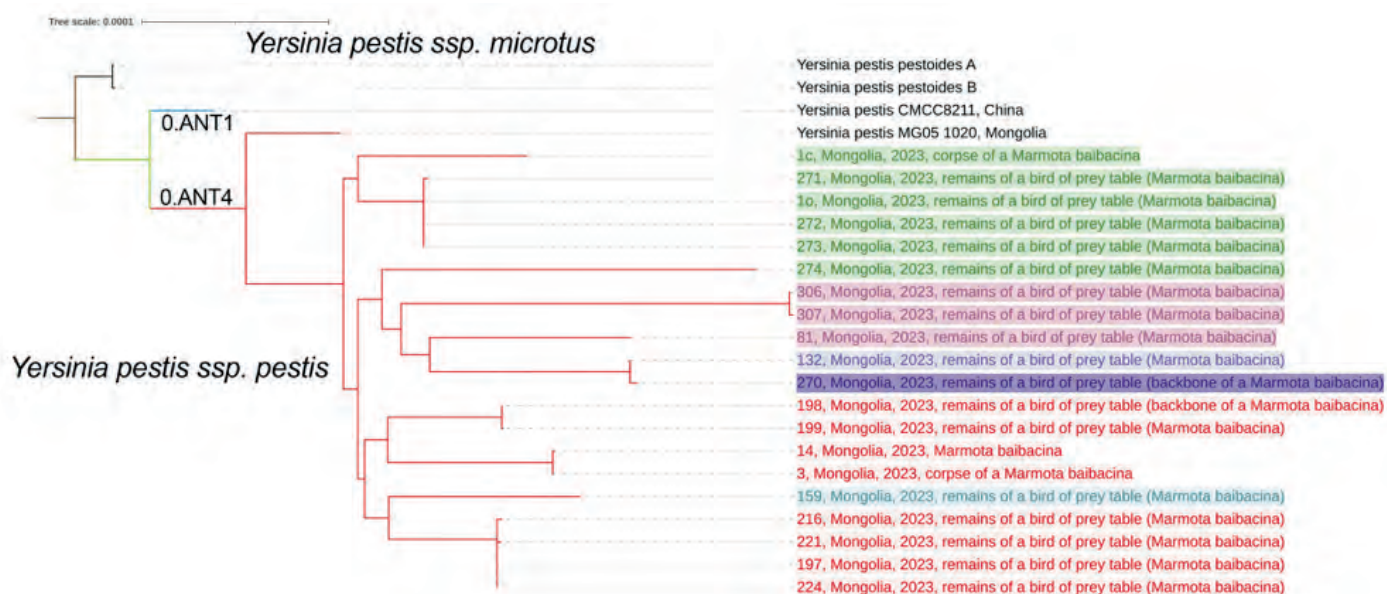


Рис. 4. Филогенетическое дерево выделенных на монгольской части Сайлюгемского природного очага чумы в 2023 г. штаммов *Y. pestis*. Цветами показаны аймаки, на территории которых был найден материал выделения культур.

Fig. 4. Phylogenetic tree of *Y. pestis* strains isolated in the Mongolian part of the Saylyugem natural plague focus in 2023. The aimags in which the culture material was found are shown in colors.

Культура *Y. pestis* была выделена из остатков стола хищной птицы. Возбудитель иерсиниоза был выделен из смывов с полок овощехранилища, из свеклы и полевки обыкновенной (*Microtus arvalis*), а также из клинического материала.

В 2023 г. было выделено 38 культур *Y. pestis* – 18 из них получены на российской территории Сайлюгемского природного очага чумы, из которых 4 были от длиннохвостых сусликов (*Urocyon undulatus*) и 14 – от сурков (*Marmota baibacina*), 20 образцов культур были получены на монгольской части Сайлюгемского очага исключительно от сурков, в основном из остатков стола хищных птиц.

Секвенирование проводилось на приборе MinION Mk 1B (Oxford Nanopore Technologies, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии).

Выявление отличий последовательностей ДНК, полученных в результате полногеномного секвенирования от корового генома для *Y. enterocolitica* и культур *Y. pestis*, выделенных в 2023 г., проходило в пакете прикладных команд Roary [5]. Для штамма *Y. pestis*, выделенного в 2022 г., были выявлены SNP относительно референсного генома с помощью пакета прикладных программ Snippy. Построение деревьев осуществлялось в программе Fasttree (ML). Данные о нуклеотидных последовательностях штаммов, использованных для

построения деревьев, кроме выделенных, были получены из GenBank NCBI.

Результаты исследования и их обсуждение

Культуры *Y. enterocolitica* были выделены в результате эпидемиологического расследования вспышки иерсиниоза в Шебалинском районе, и филогенетические связи выделенных штаммов должны были подтвердить или опровергнуть выводы, полученные в ходе расследования. Было проведено секвенирование полученных изолятов *Y. enterocolitica*. Построенное филогенетическое дерево *Y. enterocolitica* (рис. 1) показало, что все выделенные из разных источников культуры генетически единообразны (так как они объединены в одну ветвь), и, следовательно, мы можем утверждать, что источником заражения, очевидно, послужили продукты, размещенные в овощехранилище.

Филогенетическое дерево выделенного в 2022 г. штамма *Y. pestis* (рис. 2) позволило определить его как принадлежащий к филогруппе 4.ANT основного подвида, близкий к другим штаммам, выделенным на этой территории [6].

Все выделенные в 2023 г. штаммы принадлежали к филогруппе 4.ANT основного подвида [7–13]. Филогенетическое дерево позволило установить степень их родства (рис. 3) и показать, что на монгольской и российских частях очага могут циркулировать близкородственные штаммы (854) и, напротив, на одной территории могут циркулировать штаммы из разных ветвей (рис. 4).

Использование секвенирования в практике Алтайской противочумной станции позволило максимально точно типировать выделенные в 2022–2023 гг. в ходе работы штаммы особо опасных и природно-очаговых инфекций, что, в свою очередь, позволило как подтвердить результаты эпидемиологического расследования, однозначно определив источник заражения, так и получить дополнительную информацию о особенностях эпизоотического процесса путем выяснения родства циркулирующих на разных территориях штаммов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Бондарева ОС, Савченко СС, Ткаченко ГА, Абуева АИ, Муратова ЮО, Антонов ВА. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014;19(1):34–44.
2. Ерошенко ГА, Краснов ЯМ, Носов НЮ, Куклева ЛМ, Никифоров КА, Оглодин ЕГ, и др. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из

России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64

3. Еременко ЕИ, Рязанова АГ, Писаренко СВ, Аксенова ЛЮ, Семенова ОВ, Котенева ЕА, и др. Сравнительный анализ методов генетического типирования *Bacillus anthracis*. Генетика. 2019;55(1):40–51. DOI: 10.1134/S0016675819010065
4. Pightling AW, Pettengill JB, Luo Y, Baugher JD, Rand H, Strain E. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. Front Microbiol. 2018 Jul 10;9:1482. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01482
5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics. 2015 Nov 15;31(22):3691–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421
6. Балахонов СВ, Ярыгина МБ, Гладких АС, Миронова ЛВ, Феранчук СИ, Бочалгин НО, и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2019;3:34–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42
7. Ерошенко ГА, Куклева ЛМ, Кутырев ВВ. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;4:14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22
8. Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM, et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States. Front Microbiol. 2018 May 25;9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106
9. Кисличкина АА, Платонов МЕ, Варайская АС, Богун АГ, Дентовская СВ, Анисимов АП. Рациональная таксономия *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019;37(2):76–82. DOI: 10.17116/molgen20193702176
10. Suntsov VV. Molecular phylogenies of the plague microbe *Yersinia pestis*: an environmental assessment. AIMS Microbiol. 2023 Oct 16;9(4):712–723. DOI: 10.3934/microbiol.2023036
11. Платонов МЕ, Евсеева ВВ, Дентовская В, Анисимов АП. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013;2:3–12.
12. Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
13. Eaton K, Featherstone L, Duchene S, Carmichael AG, Varlik N, Golding GB, et al. Plagued by a cryptic clock: insight and issues from the global phylogeny of *Yersinia pestis*. Commun Biol. 2023 Jan 19;6(1):23. DOI: 10.1038/s42003-022-04394-6
14. Demeure CE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. Microbes Infect. 2019;21(5-6):202–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007

References

1. Bondareva OS, Savchenko SS, Tkachenko GA, Abueva AI, Muratova YuO, Antonov VA. Modern approaches to genotyping of causative agents of particularly dangerous infections. Epidemiology and Infectious Diseases. 2014;19(1):34–44. (In Russian).
2. Eroshenko GA, Krasnov YaM, Nosov NYu, Kukleva LM, Nikiforov KA, Oglodin EG, et al. Updating of intra-specific *Yersinia pestis* classification, based on the results of whole-genome sequencing of the strains from the Russian Federation and the neighboring states. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2015;4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64 (In Russian).
3. Eremenko EI, Ryazanova AG, Pisarenko SV, Aksanova LY, Semenova OV, Koteneva EA, et al. Comparative analysis of genotyping methods for *Bacillus*

- anthracis*. Russian Journal of Genetics. 2019;55(1): 40-51. DOI: 10.1134/S0016675819010065 (In Russian).
4. Pightling AW, Pettengill JB, Luo Y, Baugher JD, Rand H, Strain E. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front Microbiol.* 2018 Jul 10;9:1482. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01482
 5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015 Nov 15;31(22):3691-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421
 6. Balakhonov SV, Yarygina MB, Gladkikh AS, Mironova LV, Feranchuk SI, Bochalgin NO, et al. Molecular-Genetic Characteristics of *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Mongolian Territory of Transboundary Sailyugem Natural Plague Focus. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2019;3:34-42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42 (In Russian).
 7. Eroshenko GA, Kukleva LM, Kutyrev VV. Historical and Modern Classifications of the Plague Agent. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2022;4:14-22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22 (In Russian).
 8. Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM, et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States. *Front Microbiol.* 2018 May 25;9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106
 9. Kislichkina AA, Platonov ME, Vagaiskaya AS, Bogun AG, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Rational taxonomy of *Yersinia pestis*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2019;37(2):76-82. DOI: 10.17116/molgen20193702176 (In Russian).
 10. Suntsov VV. Molecular phylogenies of the plague microbe *Yersinia pestis*: an environmental assessment. *AIMS Microbiol.* 2023 Oct 16;9(4):712-723. DOI: 10.3934/microbiol.2023036
 11. Platonov ME, Evseeva VV, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Molecular typing of *Yersinia pestis*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2013;2:3-12. (In Russian).
 12. Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 21;101(51):17837-42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
 13. Eaton K, Featherstone L, Duchene S, Carmichael AG, Varlik N, Golding GB, et al. Plagued by a cryptic clock: insight and issues from the global phylogeny of *Yersinia pestis*. *Commun Biol.* 2023 Jan 19;6(1):23. DOI: 10.1038/s42003-022-04394-6
 14. Demeure CE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Microbes Infect.* 2019;21(5-6):202-12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007

Информация о соавторах:

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

Такысова Солоны Борисовна, биолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Югушев Арчин Юрьевич, врач-бактериолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

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

Рождественский Евгений Николаевич, директор ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Санаров Павел Петрович, зоолог зоологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

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

Денисов Алексей Васильевич, кандидат биологических наук, заведующий зоологической лабораторией ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Киреев Александр Александрович, медицинский лабораторный техник 1-й категории бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

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

Григорьева Ирина Леонидовна, старший медицинский лабораторный техник 2-й категории бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Сапкаускас Никита Викторович, медицинский лабораторный техник бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Филатов Егор Иванович, зоолог зоологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

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

Solony B. Takysova, biologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Archin Yu. Yugushev, bacteriologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

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

Evgeny N. Rozhdestvensky, Director of the Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Pavel P. Sanarov, zoologist of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Evgeny S. Polkovnikov, zoologist of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Aleksey V. Denisov, candidate of biological sciences, head of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Aleksandr A. Kireev, medical laboratory technician of the 1st category of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

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

Irina L. Grigorjeva, senior medical laboratory technician of the 2nd category of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Nikita V. Sapkauskas, medical laboratory technician of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Egor I. Filatov, zoologist of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Микробиоценоз кожи у лиц с пиодермией и микробной экземой

Ж.Г.Еремеева^{1,2}, А.Р.Фахуртдинова², О.А.Степнова², Е.О.Иванова², О.В.Платонова²,
М.Е.Гатаулина², Р.З.Ибрагимова², Е.В.Бильдюк^{2,3}, Г.Г.Вафина^{2,3}, И.К.Минуллин²

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация;

²ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге», Казань, Российская Федерация;

³ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация

Цель исследования – представить этиологическую расшифровку условно-патогенной флоры кожи у лиц с пиодермией или с микробной экземой по результатам бактериологического посева с определением их чувствительности к антимикробным препаратам.

Пациенты и методы. Был проведен ретроспективный анализ заболеваемости микробной экземой и пиодермией населения г. Казани за 2014–2023 гг. У 123 пациентов клиники (55 женщин и 68 мужчин) с диагнозом «пиодермия» или «микробная экзема» проводилось микробиологическое культуральное исследование отделяемого высыпных элементов кожи для определения этиологического агента и чувствительности к антибактериальным препаратам. Расчеты проводились в программе Microsoft Excel и онлайн-калькуляторе OpenEpi, категориальные данные представлены в виде абсолютных значений и долей (%).

Результаты. *Staphylococcus aureus* был выделен у 56 (46%) пациентов, *Staphylococcus epidermidis* – у 44 (36%), у 1 (1%) пациента был обнаружен *Staphylococcus saprophyticus*, у 9 (7%) – *Enterococcus faecalis*, у 4 (3%) – *Escherichia coli*, у 4 (3%) – *Klebsiella* spp., у 1 (1%) – *Proteus mirabilis*, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Pseudomonas aeruginosa* определились в 2% случаев (по 2 пациента). Определение чувствительности к антимикробным препаратам у *Staphylococcus* spp. продемонстрировало 262 (28,8%) устойчивых результата из 909. Из 88 поставленных тестов по определению чувствительности штаммов грамотрицательной флоры к антибиотикам устойчивы 64,8% (57 из 88), с абсолютной 100%-й устойчивостью к бензилпенициллину. Из 81 поставленного теста по определению чувствительности *Enterococcus* spp. устойчивость зарегистрирована у 63% (51) с абсолютной 100%-й (9 из 9) устойчивостью к цефокситину, линкозаминам и аминогликозидам. Анализ состояния чувствительности *C. albicans* (n = 2) к антимикотикам показал положительный результат.

Заключение. Микробиоценоз кожи 123 обследованных пациентов, не получавших специфического лечения, представлен преимущественно грамположительными бактериями рода *Staphylococcus* и *Streptococcus* (81,5%).

Ключевые слова: микробиоценоз кожи, пиодермия, микробная экзема

Для цитирования: Еремеева Ж.Г., Фахуртдинова А.Р., Степнова О.А., Иванова Е.О., Платонова О.В., Гатаулина М.Е., Ибрагимова Р.З., Бильдюк Е.В., Вафина Г.Г., Минуллин И.К. Микробиоценоз кожи у лиц с пиодермией и микробной экземой. Бактериология. 2025; 10(2): 38–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-38-44

Skin microbiocenosis in persons with pioderma and microbial eczema

Zh.G.Eremeeva^{1,2}, A.R.Fakhurtdinova², O.A.Stepnova², E.O.Ivanova², O.V.Platonova²,
M.E.Gataullina², R.Z.Ibragimova², E.V.Bildyuk^{2,3}, G.G.Vafina^{2,3}, I.K.Minullin²

¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation;

²Republican Clinical Dermatovenerologic dispensary, Kazan, Russian Federation;

³Kazan (Volga region) Federal University, Kazan University, Kazan, Russian Federation

Для корреспонденции:

Еремеева Жанна Григорьевна, кандидат медицинских наук, врач-эпидемиолог ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге», ассистент кафедры эпидемиологии и доказательной медицины Казанского государственного медицинского университета

Адрес: 420012, Казань, ул. Толстого, 4

Телефон: (843) 238-6954

E-mail: Z.Eremeeva@tatar.ru

Статья поступила 06.12.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Zhanna G. Eremeeva, PhD, MD, epidemiologist of Republican Clinical Dermatovenerologic dispensary, assistant at the Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, Kazan State Medical University

Address: 4 Tolstoy str., Kazan, 420012, Russian Federation

Phone: (843) 238-6954

E-mail: Z.Eremeeva@tatar.ru

The article was received 06.12.2024, accepted for publication 30.06.2025

The aim of the study is to present an etiological decoding of opportunistic skin flora in individuals with pyoderma or microbial eczema based on the results of bacteriological culture with determination of their sensitivity to antimicrobial drugs.

Patients and methods. A retrospective analysis of the incidence of microbial eczema and pyoderma in the population of Kazan for 2014–2023 was conducted. In 123 patients of the clinic (55 women and 68 men) diagnosed with pyoderma or microbial eczema, a microbiological cultural study of the discharge from skin rashes was performed to determine the etiological agent and sensitivity to antibacterial drugs. Calculations were performed in Microsoft Excel and the OpenEpi online calculator: categorical variables are presented as absolute values and percentages.

Results. *Staphylococcus aureus* was isolated in 56 patients (45%), *Staphylococcus epidermidis* in 44 (36%), *Staphylococcus saprophyticus* was found in one patient (1%), *Enterococcus faecalis* in 9 patients (7%), *Escherichia coli* in 4 patients (3%) and *Klebsiella* spp. in 3%, *Proteus mirabilis* in one patient (1%), yeast-like fungi of the genus *Candida* and *Pseudomonas aeruginosa* were determined in 2% of cases (2 patients each). Determination of antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. demonstrated 262 (28.8%) resistant results out of 909. Of the 88 tests performed to determine the susceptibility of gram-negative flora strains to antibiotics, 64.8%/57 out of 88 were resistant, with absolute 100% resistance to benzylpenicillin. Of the 81 tests performed to determine the susceptibility of *Enterococcus* spp., resistance was recorded in 63%/51 with absolute 100% (9 out of 9) resistance to cefoxitin, lincosamides and aminoglycosides. Analysis of the susceptibility status of *C. albicans* ($n = 2$) to antifungal drugs showed a positive result.

Conclusion. Based on the results of bacteriological examination of smears taken from the affected skin areas of 123 patients with microbial eczema before the start of etiotropic therapy, it was found that the opportunistic microflora of the skin of the examined patients was mainly represented by *Staphylococcus* and *Streptococcus* (81.5%).

Key words: skin microbiocenosis, pyoderma, microbial eczema

For citation: Eremeeva Zh.G., Fakhurtdinova A.R., Stepnova O.A., Ivanova E.O., Platonova O.V., Gataullina M.E., Ibragimova R.Z., Bilyuk E.V., Vafina G.G., Minullin I.K. Skin microbiocenosis in persons with pioderma and microbial eczema. Bacteriology. 2025; 10(2): 38–44. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-38-44

Кожа населена множеством условно-патогенных микробов (*Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pityrosporum ovale* и др.), которые при определенных обстоятельствах могут проявлять свои болезнетворные свойства, приводя к развитию пиодермии и/или экземы. Заражение, как правило, происходит при контакте с инфицированными людьми, животными и загрязненными предметами [1].

Факторами риска развития пиодермий или экземы служат [2]:

- факторы, уменьшающие бактерицидную активность, нарушение кровоснабжения, переохлаждение или перегрев кожи;
- различные причины, способствующие увеличению проницаемости кожи: хронические дерматозы, мелкие травмы, мацерация, а также недостаток витаминов А и С;
- условия, приводящие к ослаблению защитных механизмов организма: хронические инфекции, общее переохлаждение и перегревание, нарушение обмена веществ, анемии, переутомление, стресс, проблемы с эндокринной системой, гиповитаминозы;
- негативное влияние на резидентную микрофлору кожи и факторы, снижающие ее защитную функцию: частое мытье, чрезмерное использование антисептических средств, косметики и парфюмерии.

Микробный фактор играет ключевую роль в формировании патологического процесса при экземе, поскольку происходит сенсибилизация кожи к некоторым бактериальным агентам: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* и их ассоциациям [3]. Микробная заселенность пораженных участков кожи у пациентов может поддерживать и утяжелять течение болезни. Следовательно, важно знать микробный состав кожи. Так, среди микроорганизмов, выделенных с участков пораженной кожи пациентов кожно-венерических диспансеров (КВД) с дерматозами в Санкт-Петербурге, преобладали грамположительные бактерии (82,4% из 832 штаммов): ведущими видами являлись *S. aureus* (31,7%) и *S. epidermidis* (20,3%), значительно меньшей была доля *Enterococcus faecalis* (10,7%) [4]. В ходе

микробиологического исследования других авторов в Курске у 65,63% больных (из 321 обследованных) высеивали монокультуры микроорганизмов, в т.ч. стафилококков (90,63%), а у 34,38% – их ассоциации [5].

Результаты бактериологического посева образца, взятого из пораженной области кожи, обеспечивают точное выяснение свойств микроорганизмов, вызвавших кожное заболевание, и помогают выбрать наиболее подходящее средство для терапии [6–8].

Цель исследования – дать этиологическую интерпретацию условно-патогенной микрофлоры кожи у пациентов с пиодермией или микробной экземой, основываясь на данных бактериологического посева и анализа восприимчивости выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП).

Материалы и методы

Был проведен ретроспективный анализ заболеваемости микробной экземой и пиодермией населения г. Казани за 2014–2023 гг. Исследование проводилось в 2023 г. на базе Республиканского клинического кожно-венерологического диспансера Министерства здравоохранения Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге.

У 123 госпитализированных пациентов КВД с диагнозом «пиодермия» или «микробная экзема» в первые сутки после госпитализации, до начала антибиотикотерапии, отбирались мазки с патологических участков кожи для последующего бактериологического исследования с целью установления этиологии возбудителя с последующим определением чувствительности к АМП [2]. При проведении микробиологических работ и их интерпретации были использованы Методические указания 4.2.1890-04 с изменениями и дополнениями от 2022 г. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» и инструкции к применяемым наборам и тест-системам. Отобранный материал сеяли на питательные среды (5%-й кровяной агар, сахарный бульон, желточно-солевой агар). Инкубацию про-

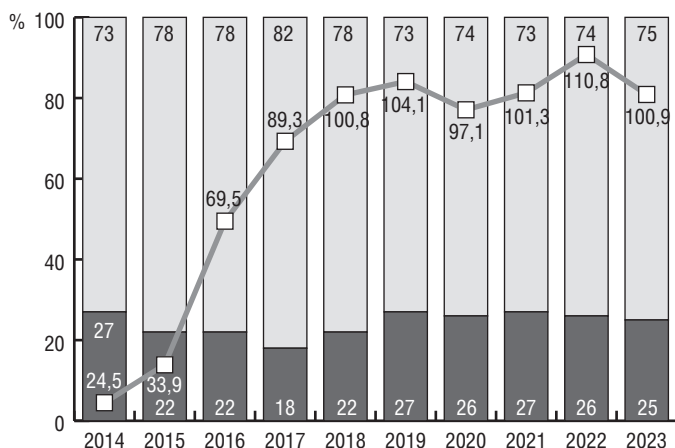


Рис. 1. Динамика заболеваемости микробной экземой населения г. Казани за 2014–2023 гг. Столбцы отражают соотношение заболевших взрослых (зеленый цвет) и детей (желтый цвет). Красная линия – заболеваемость населения на 100 тыс.
Fig. 1. Dynamics of incidence of microbial eczema among the population of Kazan for 2014–2023. The columns show the ratio of sick adults (green) to children (yellow). The red line is the incidence of the population per 100 thousand.

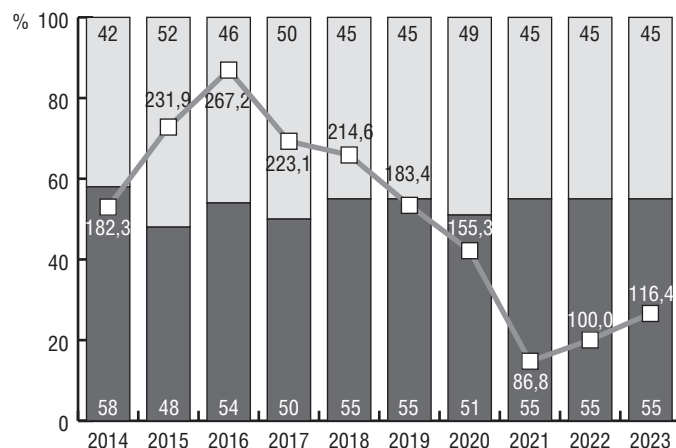


Рис. 2. Многолетняя динамика заболеваемости пиодермией населения г. Казани за 2014–2023 гг. Столбцы отражают соотношение заболевших взрослых (зеленый цвет) и детей (желтый цвет). Красная линия – заболеваемость населения на 100 тыс.
Fig. 2. Long-term dynamics of pyoderma incidence among the population of Kazan for 2014–2023. The columns show the ratio of sick adults (green) to children (yellow). The red line is the incidence of the population per 100 thousand.

водили при температуре 37°C в течение 18–24 ч. При отсутствии роста через 24 ч время инкубации увеличивали до 5 суток.

Для постановки чувствительности к АМП на чашку со средой Мюллера–Хинтон агар наносили суточную исследуемую культуру, разведенную до 0,5 McFI (стандарт мутности МакФарланда) изотоническим раствором. Бактериальную суспензию инокулировали на агар в течении 15 мин, затем в течении 15 мин наносили соответствующие диски фирмы

Bio-Rad (Франция). Контроль выполняли с использованием штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 DSM 1103, *Proteus vulgaris* ATCC 19181, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 DSM 1117, *S. aureus* ATCC 25923. Через 24 ч фиксировался результат по степени подавления роста.

Определение вида грибов проводили с использованием набора AuxeColor (Bio-Rad, Франция), системы идентификации, основанной на утилизации сахаров. Рост грибов становится видимым в результате изменения цвета рН-индикатора. Для *Candida albicans* определяли антифунгальную чувствительность набором реагентов FUNGITEST (Bio-Rad, Франция), который в своем составе содержит 6 противогрибковых препаратов: 5-фторцитозин, амфотерицин В, миконазол, кетоконазол, итраконазол, флуконазол.

Расчеты проводили в программе Microsoft Excel и онлайн калькуляторе OpenEpi, использованы абсолютные показатели и относительные в виде долей в процентах.

Критерии включения в исследование:

- наличие пораженных участков кожи с подозрением на микробную экзему или пиодермию;
- первые сутки с момента госпитализации;
- отсутствие специфического лечения на момент забора материала.

Перед началом исследования все пациенты подписали информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам проведенного ретроспективного анализа заболеваемости населения г. Казани экземой за 2014–2023 гг. установлена тенденция возрастания с 24,5 до 100,9 случая на 100 тыс. населения соответственно с преобладанием в структуре взрослого населения (от 73 до 82%) (рис. 1).

На рис. 2 представлена динамика заболеваемости населения г. Казани пиодермией за аналогичный период, отра-

Таблица 1. Локализация пораженных участков кожи пациентов с пиодермией/экземой, с которых отбирались образцы для посева (n = 123)

Table 1. Localization of pathological areas of the skin of patients with pyoderma/eczema, from which smears were taken for examination (n = 123)

Локализация / Localization	Кол-во отобранных мазков / Number of smears collected	Локализация / Localization	Кол-во отобранных мазков / Number of smears collected
Кисть руки / Hand	17	Ухо / Ear	4
Гладкая кожа / Smooth skin	16	Подмышечная область / Axillary area	3
Туловище / Torso	15	Гладкая кожа головы / Smooth scalp	3
Голень / Shin	14	Молочная железа / Mammary gland	2
Лицо / Face	13	Живот / Abdomen	2
Стопа / Foot	12	Щиколотка / Ankle	1
Паховая область / Groin	9	Лоб / Forehead	1
Волосистая часть головы / Scalp	9	Ягодица / Buttock	1
Рука / Arm	6	Предплечье / Forearm	1
Бедро / Thigh	4	Грудь / Chest	1
Спина / Back	4	Пустула / Pustule	1

жающая снижение показателей заболеваемости на 16% в 2023 г. в сравнении с 2014 г., с преобладанием в структуре детского населения (от 50 до 58%).

Из 123 обследованных пациентов с пиодермией и экземой женщин было 55, мужчин – 68. Доля лиц в возрасте 0 – 14 лет составила 36% ($n = 44$), 15–30 лет – 9% ($n = 11$), 30–50 лет – 22% ($n = 27$), 50–70 лет – 25% ($n = 31$) и старше 70 лет – 8% ($n = 10$).

Локализация патологических участков, с которых были получены образцы ($n = 123$), представлена в табл. 1.

Результаты бактериального посева патологического материала пациентов представлены на рис. 3.

Анализ полученных данных показал, что у пациентов на коже выделены преимущественно *S. aureus* (45%, $n = 56$) и *S. epidermidis* (36%, $n = 44$); у 9 (7%) человек высеяны *E. faecalis*. У равного числа пациентов – 4 (3%) – были обнаружены *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*. В 2 (2%) случаях зарегистрированы *C. albicans* и *P. aeruginosa*. В редких случаях (по 1 пациенту (1%)) были выделены *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus saprophyticus*. Полученные результаты демонстрируют наличие дисбиотических сдвигов микрофлоры кожи у данных пациентов. Схожую ситуацию микробиоценоза кожи пациентов с микробной экземой описывают другие авторы: при обследовании 228 пациентов из очагов поражения кожи в 63,5% случаев были выделены *S. aureus*, в 43,9% – *S. epidermidis*, в 3,9% – *S. saprophyticus*; в 14% – *Streptococcus pyogenes*, в 4,4% – *Propionibacterium*, в 4,8% – *Corinebacterium*, в 6,5% – *E. coli*, в 1,8% – *Proteus*, в 2,2% – *Klebsiella* [9]; в другом исследовании у 52 пациентов с экземой в острую фазу *S. aureus* высевался у 58,9%, *S. epidermidis* – у 49,3% и *S. pyogenes* – у 37,8% [11].

В Санкт-Петербурге в 2020 г. при обследовании пациентов КВД с дерматозами среди микроорганизмов, выделенных с участков пораженной кожи, доминировали грамположительные – их выявление составило примерно 82,4%, а наиболее частыми возбудителями оказались бактерии родов *S. aureus* (31,7%) и *S. epidermidis* (~20,3%), тогда как доля *E. coli* была существенно ниже (~10,7%) [11].

Результаты постановки чувствительности выделенной микрофлоры к АМП представлены в табл. 2–4.

Из общего количества ($n = 909$) постановок тестов на чувствительность *Staphylococcus* spp. к АМП (табл. 2) 66,4% оказа-

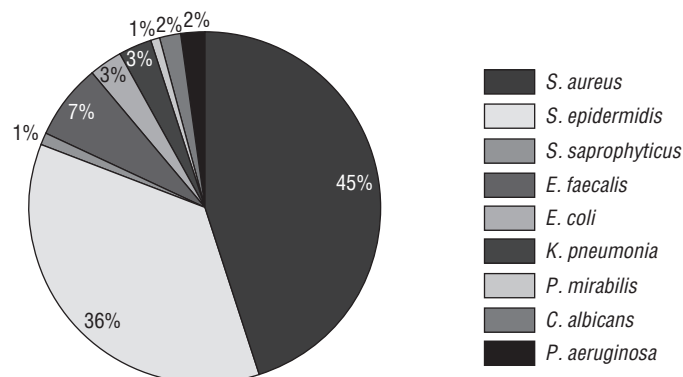


Рис. 3. Видовой состав микроорганизмов, выделенных у пациентов по результатам бактериального посева патологического материала/мазков.

Fig. 3. Species composition of microorganisms isolated from patients based on the results of bacterial culture of pathological material/smears.

лись суммарно чувствительны к разным группам антимикробных средств, 28,8% – устойчивы, а 4,7% имели промежуточный результат. Большое число штаммов (70 из 101, 69%) проявили устойчивость к бензилпенициллину, при этом 88 (87%) штаммов оставались чувствительны к амоксициллину/клавуланату; зарегистрированное число чувствительных штаммов к макролидам было почти равно количеству устойчивых: 48 и 46 соответственно (табл. 2). Самый высокий показатель чувствительности *Staphylococcus* spp. (96 из 101, 95%) зарегистрирован при постановке тестов к ванкомицину. Штаммы, устойчивые к цефокситину ($n = 21$), рассматривались как устойчивые ко всем доступным β -лактамам (пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, монобактамам) (табл. 2).

Анализ чувствительности грамотрицательной флоры к АМП в данной работе (табл. 3) демонстрирует преобладание доли (64,8%, 57 из 88) штаммов, устойчивых к АМП. Абсолютную 100%-ю устойчивость выделенные штаммы продемонстрировали к бензилпенициллину (11 из 11), равное число штаммов (9 из 11, 81%) проявили устойчивость к амоксициллину/клавуланату, тетрациклинам и макролидам, 72% (8 из 11) – к аминогликозидам; почти половина выделенных штаммов (5 из 11) грамотрицательной флоры чувствительна к цефокситину, 81% – к фторхинолонам, 72% – к хлорамфениколу (табл. 3).

Таблица 2. Чувствительность *Staphylococcus* spp. к АМП ($n = 101$)

Table 2. Sensitivity of *Staphylococcus* spp. to antimicrobial drugs ($n = 101$)

АМП / Antimicrobial drug	Чувствительный результат (S) / Sensitive result (S)	Промежуточный результат (I) / Intermediate result (I)	Устойчивый результат (R) / Sustainable result (R)
Пенициллиновая группа / Penicillin group	28	3	70
Амоксициллин/клавуланат / Amoxicillin/clavulanate	88	–	13
Цефокситин / Cefoxitin	80	–	21
Аминогликозиды / Aminoglycosides	74	5	22
Фторхинолоны / Fluoroquinolones	76	5	20
Тетрациклины / Tetracyclines	52	23	26
Макролиды / Macrolides	46	7	48
Гликопептиды (ванкомицин) / Glycopeptides (vancomycin)	96	–	5
Линкозамыны / Lincosamines	64	–	37
Всего / Total	604 (66,4%)	43 (4,7%)	262 (28,8%)

Таблица 3. Чувствительность грамотрицательной флоры к антимикробным препаратам (n = 11)
Table 3. Sensitivity of gram negative flora to antimicrobial drugs (n = 11)

АМП / Antimicrobial drug	Чувствительный результат (S) / Sensitive result (S)	Промежуточный результат (I) / Intermediate result (I)	Устойчивый результат (R) / Sustainable result (R)
Пенициллиновая группа / Penicillin group	0	–	11
Амоксициллин/клавуланат / Amoxicillin/clavulanate	2	–	9
Цефокситин / Cefoxitin	5	–	6
Аминогликозиды / Aminoglycosides	3	–	8
Фторхинолоны / Fluoroquinolones	9	–	2
Тетрациклины / Tetracyclines	2	–	9
Макролиды / Macrolides	2	–	9
Хлорамфеникол / Chloramphenicol	8	–	3
Линкозамыны / Lincosamines	–	–	–
Всего / Total	31	–	57

Таблица 4. Чувствительность *Enterococcus* spp. к антимикробным препаратам (n = 9)
Table 4. Sensitivity of *Enterococcus* spp. to antimicrobial drugs (n = 9)

АМП / Antimicrobial drug	Чувствительный результат (S) / Sensitive result (S)	Промежуточный результат (I) / Intermediate result (I)	Устойчивый результат (R) / Sustainable result (R)
Пенициллиновая группа / Penicillin group	2	–	7
Амоксициллин/клавуланат / Amoxicillin/clavulanate	8	–	1
Цефокситин / Cefoxitin	0	–	9
Аминогликозиды / Aminoglycosides	0	–	9
Фторхинолоны / Fluoroquinolones	9	–	0
Тетрациклины / Tetracyclines	4	–	5
Макролиды / Macrolides	2	–	7
Хлорамфеникол / Chloramphenicol	5	–	4
Линкозамыны / Lincosamines	0	–	9
Всего / Total	30 (37%)	–	51 (63%)

Результаты поставленных тестов (63%, 51 из 81) на чувствительность к АМП штаммов рода *Enterococcus* spp. продемонстрировали 100%-ю (9 из 9) устойчивость к цефокситину, линкозамынам и аминогликозидам; у 78% (7 из 9) зарегистрирована устойчивость к макролидам и бензилпенициллину, при сохранении у 89% (8 из 9) чувствительности к амоксициллину/клавуланату; все выделенные штаммы *Enterococcus* spp. чувствительны к фторхинолонам, а к тетрациклинам устойчивы чуть больше половины штаммов (5 из 9, 55%) (табл. 4).

Выделенные два штамма *C. albicans* оказались чувствительны к антимикотикам.

Заключение

По результатам ретроспективного анализа заболеваемости пиодермией и микробной экземой населения г. Казани за 2014–2023 гг. установлено:

- рост показателей заболеваемости экземой с 24,5 до 100,9 случая на 100 тыс. соответственно. Доля взрослого населения в структуре лиц с микробной экземой составляет 73–82%;
- показатели заболеваемости пиодермией снизились в 2023 г. и составили 116,4 на 100 тыс. населения по сравнению с данными за 2014 г.: 182,3 на 100 тыс. населения. Доля детей в структуре этой нозологии составляет 50–58%.

Основными микроорганизмами, выделенными с пораженных участков кожи у обследованных пациентов с микробной экземой и пиодермией (n = 123), явились *S. aureus* и *S. epidermidis*: 45 и 36% соответственно.

Из 909 поставленных тестов по определению чувствительности штаммов *Staphylococcus* spp. к АМП получено 604 (66,4%) чувствительных штамма, 262 (28,8%) устойчивых, 43 (4,7%) образца с промежуточной устойчивостью. При этом 21 штамм был устойчивым к цефокситину.

Из 88 поставленных тестов по определению чувствительности штаммов грамотрицательной флоры к антибиотикам устойчивость зарегистрирована у 64,8% (57 из 88), промежуточная устойчивость не регистрировалась. Абсолютная 100%-я устойчивость была к бензилпенициллину.

Из 81 поставленного теста по определению чувствительности *Enterococcus* spp. устойчивость зарегистрирована у 63% (n = 51) с абсолютной 100%-й (9 из 9) устойчивостью к цефокситину, линкозамынам и аминогликозидам.

Два штамма *C. albicans* были чувствительны к антимикотикам.

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.

Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациента.

Informed consent

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

Литература

1. Мураталиева МА. Микробная экзема (обзор литературы). Известия ВУЗов Кыргызстана. 2023;5:63-65.
2. Клинические рекомендации Российского общества дерматовенерологов и косметологов [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cnikvi.ru/klinicheskie-rekomendacii-rossijskogo-obshchestva/> (дата обращения: 01.12.2024).
3. Солдатенко НА, Шеренговская ЮВ, Прохоров ДВ, Горлова НА. Микробная экзема – воспалительное заболевание кожи. Таврический медико-биологический вестник. 2020;23(3):117-124. DOI: 10.37279/2070-8092-2020-23-3-117-124
4. Нестерова ЕВ, Трофимова НН, Козлова НС, Гусева УС, Сагомонов АВ, Метляева АВ. Видовой состав микробиоты кожи у больных дерматозами. Бактериология. 2021;6(3):57.
5. Силина ЛВ, Щербинина АВ. Эффективность применения комбинированных наружных средств в терапии микробной экземы. Молодежный инновационный вестник. 2024;13(2):125-127.
6. Тлиш ММ, Кузнецова ТГ, Наатыж ЖЮ, Псавок ФА. Микробная экзема: возможности коррекции на современном этапе. Вестник дерматологии и венерологии. 2018;94(4):60-67. DOI: 10.25208/0042-4609-2018-94-4-60-67
7. Ковалева ЮС, Комкина НГ. Микробная экзема – триггерные точки воздействия. Медицинский совет. 2023;17(2):37-44. DOI: 10.21518/ms2022-031
8. Короткий ВН, Андреев ОН, Шемшук МИ, Короткий НГ. Динамика микробного спектра у детей с микробной экземой на фоне терапии. Клиническая дерматология и венерология. 2022;21(2):188-193. DOI: 10.17116/klinderma20221021188
9. Силина ЛВ, Шварц НЕ. Микробиом кожи при микробной экземе. Клиническая дерматология и венерология. 2019;18(1):49-55. DOI: 10.17116/klinderma20191801149
10. Билалова КА. Особенности микробиоценоза кожи у больных микробной экземой. Scientist (Russia). 2022;2(20):4-10.
11. Метляева АВ, Нестерова ЕВ, Трофимова НН. Микробиота кожи у больных дерматозами. Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2021;16(2):441-447.

References

4. Nesterova EV, Trofimova NN, Kozlova NS, Guseva US, Sagomonov AV, Metlyayeva AV. Species composition of skin microbiota in patients with dermatoses. Bacteriology. 2021;6(3):57. (In Russian).
5. Silina LV, Shcherbinina AV. Efficiency of using combined external agents in the treatment of microbial eczema. Youth Innovation Bulletin. 2024;13(2):125-127. (In Russian).
6. Tlish MM, Kuznetsova TG, Naatyzh ZhYu, Psavok FA. Microbial eczema: possibilities of correction at the present stage. Bulletin of Dermatology and Venereology. 2018;94(4):60-67. DOI: 10.25208/0042-4609-2018-94-4-60-67 (In Russian).
7. Kovaleva YuS, Komkina NG. Microbial eczema – trigger points of exposure. Medical Council. 2023;17(2):37-44. DOI: 10.21518/ms2022-031 (In Russian).
8. Korotkiy VN, Andreenko ON, Shemshuk MI, Korotkiy NG. Dynamics of the microbial spectrum in children with microbial eczema during therapy. Clinical Dermatology and Venereology. 2022;21(2):188-193. DOI: 10.17116/klinderma20221021188 (In Russian).
9. Silina LV, Schwartz NE. Skin microbiome in microbial eczema. Clinical Dermatology and Venereology. 2019;18(1):49-55. DOI: 10.17116/klinderma20191801149 (In Russian).
10. Bilalova KA. Features of the skin microbiocenosis in patients with microbial eczema. Scientist (Russia). 2022;2(20):4-10. (In Russian).
11. Metlyayeva AV, Nesterova EV, Trofimova NN. Skin microbiota in patients with dermatoses. Health is the Basis of Human Potential: Problems and Solutions. 2021;16(2):441-447. (In Russian).

Информация о соавторах:

Фохуртдинова Альфия Руздановна, заведующая централизованной бактериологической лабораторией ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Степнова Ольга Александровна, врач-бактериолог ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Иванова Екатерина Олеговна, врач-бактериолог ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Платонова Ольга Валентиновна, заместитель главного врача по лабораторной диагностике ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Гатаулина Марина Егоровна, медицинский статистик ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Ибрагимова Ризид Зинатулловна, заведующая организационно-методическим отделом ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Вафина Гузель Гакильевна, заместитель главного врача по поликлинической работе ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»; преподаватель кафедры профилактической медицины Казанского (Приволжского) федерального университета

Бильдюк Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по медицинской части ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»; преподаватель кафедры профилактической медицины Казанского (Приволжского) федерального университета

Минуллин Искандэр Кагапович, главный врач ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. А.Г.Ге»

Information about co-authors:

Alfiya R. Fakhurtdinova, Head of the Centralized Bacteriological Laboratory, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Olga A. Stepnova, bacteriologist, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Ekaterina O. Ivanova, bacteriologist, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Olga V. Platonova, Deputy Chief Physician for Laboratory Diagnostics, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Marina E. Gataullina, medical statistician, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Rizida Z. Ibragimova, head of the organizational and methodological department, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Guzel G. Vafina, Deputy Chief Physician for Outpatient Work, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan; Lecturer at the Department of Preventive Medicine of Kazan (Volga region) Federal University

Evgenia V. Bilyuk, PhD, MD, Deputy Chief Physician for Medical Affairs, Lecturer at the Department of Preventive Medicine of Kazan (Volga region) Federal University

Iskander K. Minullin, chief physician, Professor A.G.Ge Republican Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

НОВОСТИ НАУКИ

Самовосстанавливающийся бетон с бактериями-ремонтниками

Разработаны природные многофункциональные полимерные волокна (называемые BioFiber) для доставки биосамовосстанавливающихся агентов в цементирующие материалы. Биоволокна были изготовлены с использованием несущего сердцевинного волокна, оболочки из гидрогеля, наполненного эндоспорами, и внешнего слоя полимерной оболочки, чувствительного к повреждениям. Инновационный BioFiber объединяет три ключевые функции в квазихрупкую матрицу: (i) автономное биосамовосстановление, (ii) контроль роста трещин и (iii) чувствительность к повреждениям. Гидрогелевая оболочка содержала эндоспоры в качестве биологических агентов, обеспечивающих микробиологически индуцированное осаждение карбоната кальция (MICCP) в качестве конечного продукта самовосстановления. Волокна сердцевины обеспечивали функцию контроля роста трещин в квазихрупких конструкционных материалах. Кроме того, покрытие внешней оболочки включает в себя надежную стратегию активации самовосстановления бетона, реагирующую на повреждения. Было проведено комплексное параметрическое исследование для изучения вариантов материалов и влиятельных параметров для адаптации свойств структуры обрабатываемых композиций разработанного BioFiber. Результаты этого исследования показали, что концентрация 8 мас./об. альгината натрия, сшитого ацетатом кальция, обеспечивает более высокую способность поглощения раствора, необходимую для MICCP. Что касается оболочки, полимерная смесь полистирола и полимолочной кислоты (1:1 мас.%) с соотношением полимер/растворитель 18 мас./об. для однослойного покрытия эффективно защищает BioFibers во время моделирования процесса заливки бетона. Наконец, каждое биоволокно способно производить 40–80 мг карбоната кальция в течение первых 30 часов активации.

Houshmand Khaneghahi M. et al.

Development of a nature-inspired polymeric fiber (BioFiber) for advanced delivery of self-healing agents into concrete. Construction and Building Materials 408, 133765 (2023).

Технология импульсного света эффективно убивает вредные патогены

«Техника импульсного света обещает стать эффективной альтернативой химическим, тепловым и водным противомикробным технологиям, обычно используемым в пищевой промышленности, и может быть применима в более широком смысле в дезинфицированных средах, таких как больницы, водоочистные сооружения и фармацевтические заводы. исследователи.

По оценкам Центров по контролю за заболеваниями, более 9 миллионов человек заболевают, 56 000 госпитализируются и 1300 умирают ежегодно в США из-за болезней пищевого происхождения. Несмотря на совершенствование технологий и ужесточение регулирования, загрязнение пищевых продуктов остается глобальной проблемой с серьезными последствиями для общественного здравоохранения, пояснил Али Демирчи, профессор сельскохозяйственной и биологической инженерии в Пенсильванском университете и член исследовательской группы.

Исследование показало, что направленные импульсы света широкого спектра вызывают бактерицидный ответ на *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, споры *Aspergillus niger* и споры *Penicillium roqueforti*. Исследование также определило спектр и энергетические характеристики импульсного света и обнаружило, что ультрафиолетовое излучение играет важную роль в этом процессе.»

*Технология импульсного света эффективно убивает вредные патогены – Новости биотехнологий.
Available at: <https://bio-news.ru/tehnologiya-impulsnogo-sveta-effektivno-ubivaet-vrednye-patogeny/>.*

Фенотипические проявления и молекулярно-генетические особенности антибиотикорезистентности клинических изолятов *Enterococcus* spp.

Н.А.Гординская, Е.В.Борискина, Е.В.Беляева, А.Е.Алексеева, Д.В.Кряжев, Н.Н.Зайцева

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация

В настоящее время доказана этиологическая роль энтерококков в развитии инфекций мочевыводящих путей, кожи, мягких тканей и даже кровотока. Наиболее распространенными видами, вызывающими заболевания человека, являются *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. В последние годы отмечается увеличение количества энтерококков, устойчивых к различным антибактериальным препаратам, в т.ч. к гликопептидам. Целью настоящего исследования было определение фенотипа и генотипа антибиотикорезистентности энтерококков, выделенных из различных биосубстратов у пациентов г. Нижний Новгород. Результаты анализа 97 штаммов энтерококков (*E. faecium* ($n = 32$) и *E. faecalis* ($n = 65$)) показали высокий уровень фенотипической антибиотикорезистентности. К фторхинолонам были резистентны более 50% штаммов, к β -лактамам – четверть всех изученных энтерококков. Среди изученных энтерококков 6,2% штаммов характеризовались фенотипом резистентности к ванкомицину, 2,1% (представители *E. faecium*) проявляли фенотипическую устойчивость к линезолиду. Все изученные энтерококки были чувствительны к тигециклину. Детерминанты антибиотикорезистентности представлены генами *efrA* и *efrB* активации эффлюксных насосов, *vanA*, кодирующим устойчивость к ванкомицину, и *cfrD*, обуславливающим резистентность к линезолиду.

Ключевые слова: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, антибиотикорезистентность, ванкомицин-устойчивые штаммы, детерминанты устойчивости

Для цитирования: Гординская Н.А., Борискина Е.В., Беляева Е.В., Алексеева А.Е., Кряжев Д.В., Зайцева Н.Н. Фенотипические проявления и молекулярно-генетические особенности антибиотикорезистентности клинических изолятов *Enterococcus* spp. Бактериология. 2025; 10(2): 45–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-45-49

Phenotypic manifestations and molecular-genetic features of antibiotic resistance of clinical isolates of *Enterococcus* spp.

N.A.Gordinskaya, E.V.Boriskina, E.V.Belyaeva, A.E.Alekseeva, D.V.Kryazhev, N.N.Zaytseva

Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Currently the etiological role has been proven enterococcus in the development of urinary tract infection, skin, soft tissues and even blood flow. The most common species that cause human disease are *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. In recent years, there has been an increase in the number enterococci resistant to various antibacterial drugs, including glycopeptides. The purpose of this study was to determine the phenotype and genotype of antibiotic resistance enterococci isolated from various biosubstrates of patients in the Nizhny Novgorod city. The results of analysis of 97 enterococcal strains (32 *E. faecium* and 65 *E. faecalis*) showed a high level of phenotypic antibiotic resistance. More than half of the strains were resistant to fluoroquinolones, and a quarter of all enterococci studied were resistant to β -lactams. Among the enterococci studied 6.2% of the strains were characterized by the phenotype resistance to vancomycin, 2.1% of the strains (representatives of *E. faecium*) showed phenotypic resistance to linezolid. All studied enterococci were sensitive to tigecycline. The determinants of antibiotic resistance are represented *efrA* and *efrB* by efflux activation genes, *vanA* encoding resistance to vancomycin and *cfrD* causing resistance to linezolid.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, antibiotic resistance, vancomycin resistant strains, determinants of sustainability

Для корреспонденции:

Гординская Наталья Александровна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Адрес: 603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71

Статья поступила 10.12.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Natalya A. Gordinskaya, MD, PhD, DSc, Senior Researcher at the Laboratory of Microbiology of Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor

Address: 71 Malaya Yamskaya str., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The article was received 10.12.2024, accepted for publication 30.06.2025

For citation: Gordinskaya N.A., Boriskina E.V., Belyaeva E.V., Alekseeva A.E., Kryazhev D.V., Zaytseva N.N. Phenotypic manifestations and molecular-genetic features of antibiotic resistance of clinical isolates of *Enterococcus* spp. Bacteriology. 2025; 10(2): 45–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-45-49

Бактерии рода *Enterococcus* распространены в природе повсеместно и представлены многочисленными видами: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. flavescens*, *E. irae*, *E. malodoratus*, *E. dispar*, *E. mundtii* и др. Энтерококки встречаются как представители нормобиоты и играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек. У здоровых людей они заселяют желудочно-кишечный тракт, женские половые органы, уретру, носоглотку и кожные покровы [1, 2]. Долгое время энтерококки относили к микроорганизмам, не вызывающим инфекционных процессов. В настоящее время доказана этиологическая роль энтерококков в развитии инфекций мочевыводящих путей, кожи, мягких тканей и даже кровотока [3–6]. Как возбудители внутрибольничных инфекций энтерококки занимают второе место после коагулазонегативных стафилококков [7]. В последние годы отмечается увеличение количества энтерококков, устойчивых к различным антибактериальным препаратам, в т.ч. к гликопептидам [8–11]. В большинстве случаев резистентные к ванкомицину штаммы *E. faecium* или *E. faecalis* выделяют из мочи [12, 13]. У животных антибиотикорезистентные энтерококки, так же как и у людей, вызывают многочисленные инфекционные процессы [14]. При всем видовом многообразии энтерококков наиболее распространенными видами, вызывающими заболевания человека, являются *E. faecalis* и *E. faecium*. Именно эти виды энтерококков по причине их антибиотикорезистентности включены экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в группу ESKAPE-патогенов, требующих особого внимания [15].

Целью настоящего исследования было определение фенотипа и генотипа антибиотикорезистентности энтерококков, выделенных из различных биосубстратов пациентов медицинских организаций г. Нижний Новгород.

Материалы и методы

Проанализированы 97 штаммов энтерококков, выделенных в течение 2023–2024 гг. из носоглоточной слизи, мочи, фекалий, раневого отделяемого, крови у стационарных пациентов различных медицинских организаций г. Нижний Новгород и находящихся в рабочей коллекции микробных культур лаборатории микробиологии ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора.

Видовую идентификацию энтерококков проводили с помощью набора биохимических тестов En-coccus test (Erba Mannheim). Определение фенотипических проявлений чувствительности к антибиотикам у всех энтерококков определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона (HiMedia) с помощью дисков (Bioanalyse). Категории чувствительности к антимикробным препаратам у энтерококков устанавливали на основании диаметра зоны задержки роста вокруг дисков с антимикробными препаратами по таблицам рекомендаций МАКМАХ «Определение чувстви-

тельности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2024-02. Для контроля качества определения чувствительности к антибиотикам использовали музейные штаммы *E. faecalis* 29212 и *E. faecalis* 51299.

Для проведения полногеномного секвенирования были отобраны 9 изолятов с множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам, из них 5 – *E. faecium* и 4 – *E. faecalis*. Выделение бактериальной ДНК энтерококков выполняли с использованием набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ, Москва) согласно инструкции производителя. Оценку концентрации ДНК проводили с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, Австрия) и набора Spectra Q HS для количественного определения ДНК (0,2–100 нг) (Raissol, Россия). Подготовку библиотек ДНК для секвенирования на платформе DNBSEQ-G50 проводили согласно инструкции производителя с использованием следующих наборов: набор для быстрой подготовки библиотек ДНК MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set, набор для циркуляризации ДНК с двойными баркодами для секвенирования на платформе DNBSEQ MGIEasy Dual Barcode Circularization Kit, набор праймеров для парноконцевого секвенирования двойных баркодов CPAS Barcode Primer 3 Reagent Kit (BGI, Китай). Секвенирование готовых библиотек проводили с использованием набора для секвенирования DNBSEQ-G50RS High-throughput Sequencing Set (FCL PE100). Сборку прочтений de novo осуществляли с помощью программного обеспечения SPAdes. Для поиска детерминант антибиотикорезистентности использовался сервис RGI (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) базы данных CARD.

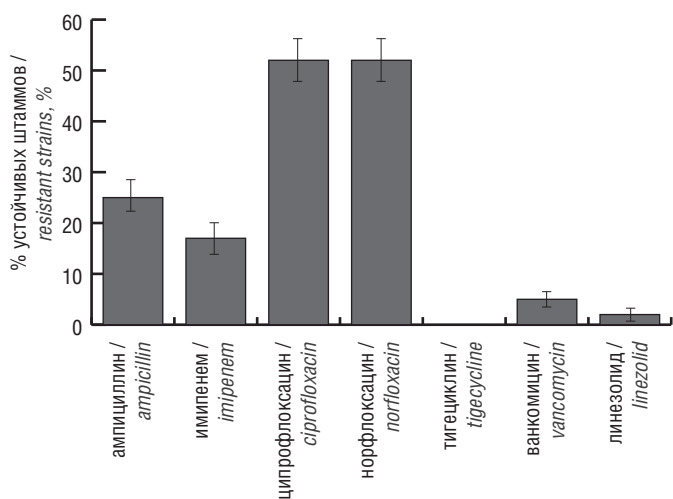
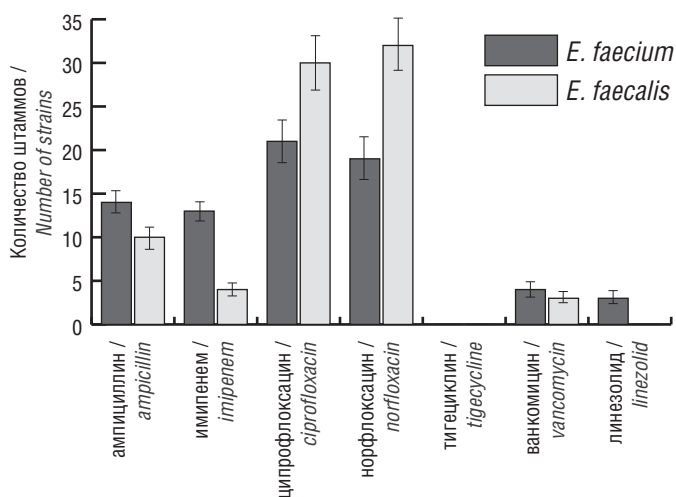
Статистическая обработка полученных результатов осуществлена с помощью программы Microsoft Excel 2013. Применены методы описательной статистики: вычислялось среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD), $p < 0,05$. Результаты представлялись в виде $M \pm SD$.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что из всех изученных энтерококков 32 штамма принадлежали к виду *E. faecium*, 65 – *E. faecalis*. В результате анализа фенотипа антибиотикорезистентности выявлено большое количество изолятов, устойчивых к препаратам разных классов. Самый высокий уровень резистентности энтерококков зарегистрирован в отношении фторхинолонов, к цiproфлоксацину и норфлоксацину проявляли фенотипическую устойчивость более половины изученных штаммов (рис. 1).

Устойчивость к фторхинолонам обусловлена активацией ABC (ATP-binding cassette) эффлюксных помп, что подтверждается наличием генов *efrA* и *efrB* у всех фенотипически резистентных к цiproфлоксацину штаммов энтерококков.

В целом изоляты *E. faecalis* проявляли невысокий уровень антибиотикорезистентности, исключением были фторхинолоны.

Рис. 1. Фенотип антибиотикорезистентности *Enterococcus* spp., (%).Fig. 1. Phenotype of antibiotic resistance of *Enterococcus* spp., (%).Рис. 2. Доля антибиотикорезистентных *E. faecium* ($n = 32$) и *E. faecalis* ($n = 65$).Fig. 2. The proportion of antibiotic-resistant *E. faecium* ($n = 32$) and *E. faecalis* ($n = 65$)

Наибольшее число фенотипически устойчивых штаммов к антибиотикам разных классов выявлено среди энтерококков вида *E. faecium* (рис. 2). Так, доля штаммов *E. faecium*, устойчивых к β -лактамам, составила 40,6%, а *E. faecalis* – 10,7% ($p = 0,002217$).

Устойчивость к β -лактамам проявляли в среднем четвертая часть штаммов энтерококков. Генов, кодирующих продукцию пенициллиназ, в геномах изученных штаммов *E. faecalis* и *E. faecium* не было выявлено; по всей вероятности, резистентность к β -лактамам связана с активацией эффлюксных насосов, что проявлялось фенотипической чувствительностью 31,0% изолятов в отношении карбапенемов только при максимальных дозировках препарата.

В работе обнаружены ванкомицин-резистентные изоляты (VRE): 2 штамма *E. faecalis* и 4 – *E. faecium*, при этом устойчивость к ванкомицину подтверждается присутствием в геноме данных энтерококков кластера *vanA* с наличием всех семи его генов (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*).

Штаммы, устойчивые к линезолиду, обнаружены только среди *E. faecium* ($n = 2$), в геноме обоих штаммов при этом присутствует ген *cfrD* [8]. Следует отметить, что один из линезолид-устойчивых штаммов проявлял фенотипическую резистентность и к линезолиду, и к ванкомицину и отличался одновременным наличием генов *cfrD* и *vanA*. В числе представителей вида *E. faecalis* устойчивых к линезолиду штаммов не обнаружено. Все изученные штаммы характеризовались чувствительностью к тигециклину, представитель глицилциклинов оказался единственным антибактериальным препаратом со 100%-й активностью в отношении энтерококков.

Таким образом, большое количество энтерококков, выделенных у пациентов с различными воспалительными заболеваниями, в настоящее время характеризуются высоким уровнем приобретенной антибиотикорезистентности и имеют фенотип бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. По данным ВОЗ, именно энтерококки вида *E. faecium* включены в перечень микроорганизмов с критическим уровнем антибиотикорезистентности, требующих пристального внимания и поиска новых препаратов [15].

Среди возбудителей различных инфекционных процессов в настоящее время выделяют энтерококки видов *E. faecalis* и *E. faecium*, которые обладают устойчивостью к антибактериальным препаратам. Антибиотикорезистентность энтерококков распространяется не только на β -лактамы препараты и фторхинолоны, но также отмечается и к гликопептидам и оксазолидинонам. Резистентность изолятов *E. faecium* в данном исследовании была в целом выше, чем *E. faecalis*, что согласуется с литературными данными [10].

У штаммов *E. faecium*, устойчивых к линезолиду, обнаружен ген *cfrD*. Данный ген впервые был выявлен у *Staphylococcus sciuri* и обуславливал устойчивость к хлорамфениколу, в последующем было показано, что ген *cfr* отвечает за резистентность к нескольким классам антибиотиков, включая линезолид, но не тедизолид [7]. У энтерококков наличие гена *cfr*, как правило, кодирует резистентность к линезолиду [11].

Развитие резистентности энтерококков к пенициллинам и карбапенемам может быть связано с модификацией пенициллин-связывающего белка (penicillin-binding proteins/PBPs) за счет точечных мутаций (Tyr605His и Pro520Ser) в гене *croR*, кодирующем Pbp4(5) [3]. В данной работе мутационных изменений пенициллин-связывающих белков не было выявлено, однако у всех штаммов обнаружены гены *efrA*, *B*, кодирующие активацию эффлюксных помп, что обуславливает их высокую устойчивость к антибиотикам разных классов, включая фторхинолоны.

В геноме ванкомицин-резистентных энтерококков присутствовали гены антибиотикорезистентности *VanR*, *VanS*, *VanH*, *VanA*, *VanX*, *VanY*, *VanZ*. Фенотип *VanA* является в настоящее время наиболее распространенным и обеспечивает высокий уровень резистентности к ванкомицину и тейкопланину. Детерминанта устойчивости фенотипа *VanA* локализуется на плазмидах или на хромосомах. Экспрессия генов устойчивости регулируется двухкомпонентной системой, состоящей из гистидинкиназы *VanS* и регулятора цитоплазматического ответа *vanR* [7]. *VanS* и *VanR* активируют транскрипцию генов, ответственных за синтез лигазы D-Ala-

D-Лас, что приводит к резистентности к ванкомицину. Следует отметить появление у некоторых ванкомицин-резистентных энтерококков зависимости от гликопептидов, когда гликопептиды нужны для их роста [3].

Современными исследованиями показано, что плазмиды резистентности (R-плазмиды) имеют широкий круг «хозяев» и могут передаваться между различными типами бактерий, в т.ч. между грамотрицательными и грамположительными бактериями, при этом *E. faecalis* может действовать как естественный челночный вектор для широкого распространения R-плазмид в кишечнике млекопитающих [16]. В такой ситуации становится возможным распространение множественной устойчивости энтерококков к антибиотикам разных классов.

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. Баранцевич НЕ, Волкова СВ, Зарицкий АЮ, Баранцевич ЕП. Антимикробная резистентность энтерококков. Антибиотики и химиотерапия. 2021;66(9-10):12-16. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-12-16
2. Suvorov A, Ermolenko E, Alechina A, Chernysh A, Keraseva A, DiPierro F. Enterococci as probiotics: what is the advantage? Nutrafoods. 2019;1:17-25. DOI: 10.17470/NF-019-000317
3. Федорова АВ. Фенотипические и генотипические особенности *Enterococcus* spp., выделенных из крови больных с гематологическими заболеваниями. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. 2022.
4. Bhatti JM, Raza SA, Alam AF, Khan YN, Mala A, Batool I, et al. Antibiotic choices among healthcare professionals for enterococcal bacteremia with patterns of resistance and risk factors of mortality, in settings of poor antibiotic stewardship program – a five-year retrospective cohort study. BMC Infect Dis. 2023 Aug 6;23(1):514. DOI: 10.1186/s12879-023-08498-0
5. Khan A, Davlieva M, Panesso D, Rincon S, Miller WR, Diaz L, et al. Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Dec 26;116(52):26925-26932. DOI: 10.1073/pnas.1916037116
6. Souhail B, Le Maréchal M, Manuella R, Chrétien R, Charlot P, Déroutilhes G, et al. Antibiotic therapy for *Enterococcus* bacteraemia: warning for the antimicrobial stewardship team. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Nov;38(11):2087-2095. DOI: 10.1007/s10096-019-03645-5
7. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM, Pichon B, Kinnevey PM, Earls MR, et al. Novel multiresistance cfr plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. J Antimicrob Chemother. 2017 Dec 1;72(12):3252-3257. DOI: 10.1093/jac/dkx292
8. Мартынова АВ, Ускова СС. Анализ устойчивости бактерий рода *Enterococcus* к антибиотикам. Тихоокеанский медицинский журнал. 2024;(2):55-59. DOI: 10.34215/1609-1175-2024-2-55-59
9. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin

in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. Drug Resist Updat. 2018 Sep;40:25-39. DOI: 10.1016/j.drup.2018.10.002

10. Bender JK, Klare I, Fleige C, Werner G. A Nosocomial Cluster of Tigecycline- and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates and the Impact of *rpsJ* and *tet(M)* Mutations on Tigecycline Resistance. Microb Drug Resist. 2020 Jun;26(6):576-582. DOI: 10.1089/mdr.2019.0346
11. Dadashi M, Sharifian P, Bostanshirin N, Hajikhani B, Bostanghadiri N, Khosravi-Dehaghi N, et al. The Global Prevalence of Daptomycin, Tigecycline, and Linezolid-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains From Human Clinical Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Med (Lausanne). 2021 Sep 10;8:720647. DOI: 10.3389/fmed.2021.720647
12. Коменкова ТС, Зайцева ЕА. Современные представления о механизмах резистентности к антимикробным препаратам *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Антибиотики и химиотерапия. 2020;65(11-12):38-48. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-11-12-38-48
13. Guan L, Beig M, Wang L, Navidifar T, Moradi S, Motallebi Tabaei F, et al. Global status of antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates: systematic review and meta-analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2024 Aug 24;23(1):80. DOI: 10.1186/s12941-024-00728-w
14. Oguttu JW, Qekwana DN, Odoi A. Prevalence and Predictors of Antimicrobial Resistance Among *Enterococcus* spp. From Dogs Presented at a Veterinary Teaching Hospital, South Africa. Front Vet Sci. 2021 Jan 7;7:589439. DOI: 10.3389/fvets.2020.589439
15. World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistance Bacteria to Guide Research Discovery and Development of New Antibiotics. Geneva Available at: //apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/lis23171en/. Accessed August 2019.
16. Yang QE, Ma X, Zeng L, Wang Q, Li M, Teng L, et al. Interphylum dissemination of NDM-5-positive plasmids in hospital wastewater from Fuzhou, China: a single-centre, culture-independent, plasmid transmission study. Lancet Microbe. 2024 Jan;5(1):e13-e23. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00227-6

References

1. Barantsevich NE, Volkova SV, Zaritsky AYU, Barantsevich EP. Antimicrobial Resistance in Enterococci. Antibiotics and Chemotherapy. 2021;66(9-10):12-16. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-12-16 (In Russian).
2. Suvorov A, Ermolenko E, Alechina A, Chernysh A, Keraseva A, DiPierro F. Enterococci as probiotics: what is the advantage? Nutrafoods. 2019;1:17-25. DOI: 10.17470/NF-019-000317
3. Fedorova AV. Fenotipicheskie i genotipicheskie osobennosti *Enterococcus* spp., vydelennykh iz krovi bol'nykh s gematologicheskimi zabolevaniyami. Avtoref. diss. ... kand. med. nauk. 2022. (In Russian).
4. Bhatti JM, Raza SA, Alam AF, Khan YN, Mala A, Batool I, et al. Antibiotic choices among healthcare professionals for enterococcal bacteremia with patterns of resistance and risk factors of mortality, in settings of poor antibiotic stewardship program – a five-year retrospective cohort study. BMC Infect Dis. 2023 Aug 6;23(1):514. DOI: 10.1186/s12879-023-08498-0
5. Khan A, Davlieva M, Panesso D, Rincon S, Miller WR, Diaz L, et al. Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Dec 26;116(52):26925-26932. DOI: 10.1073/pnas.1916037116
6. Souhail B, Le Maréchal M, Manuella R, Chrétien R, Charlot P, Déroutilhes G, et al. Antibiotic therapy for *Enterococcus* bacteraemia: warning for the antimicrobial stewardship team. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Nov;38(11):2087-2095. DOI: 10.1007/s10096-019-03645-5
7. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM, Pichon B, Kinnevey PM, Earls MR, et al. Novel multiresistance cfr plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*

- (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. J Antimicrob Chemother. 2017 Dec 1;72(12):3252-3257. DOI: 10.1093/jac/dkx292
8. Martynova AV, Uskova SS. Analysis of antibiotic resistance in *Enterococcus*. Pacific Medical Journal. 2024;(2):55-59. DOI: 10.34215/1609-1175-2024-2-55-59 (In Russian).
 9. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. Drug Resist Updat. 2018 Sep;40:25-39. DOI: 10.1016/j.drug.2018.10.002
 10. Bender JK, Klare I, Fleige C, Werner G. A Nosocomial Cluster of Tigecycline- and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates and the Impact of *rpsJ* and *tet(M)* Mutations on Tigecycline Resistance. Microb Drug Resist. 2020 Jun;26(6):576-582. DOI: 10.1089/mdr.2019.0346
 11. Dadashi M, Sharifian P, Bostanshirin N, Hajikhani B, Bostanghadiri N, Khosravi-Dehaghi N, et al. The Global Prevalence of Daptomycin, Tigecycline, and Linezolid-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains From Human Clinical Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Med (Lausanne). 2021 Sep 10;8:720647. DOI: 10.3389/fmed.2021.720647
 12. Komenkova TS, Zaitseva EA. Modern View on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Resistance Mechanisms to Antibiotics. Antibiotics and Chemotherapy. (Антибиотики и химиотерапия) 2020;65(11-12):38-48. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-11-12-38-48 (In Russian).
 13. Guan L, Beig M, Wang L, Navidifar T, Moradi S, Motallebi Tabaei F, et al. Global status of antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates: systematic review and meta-analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2024 Aug 24;23(1):80. DOI: 10.1186/s12941-024-00728-w
 14. Oguttu JW, Qekwana DN, Odoi A. Prevalence and Predictors of Antimicrobial Resistance Among *Enterococcus* spp. From Dogs Presented at a Veterinary Teaching Hospital, South Africa. Front Vet Sci. 2021 Jan 7;7:589439. DOI: 10.3389/fvets.2020.589439
 15. World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistance Bacteria to Guide Research Discovery and Development of New Antibiotics. Geneva Available at: [//apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/lis23171en/](https://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/lis23171en/). Accessed August 2019.
 16. Yang QE, Ma X, Zeng L, Wang Q, Li M, Teng L, et al. Interphylum dissemination of NDM-5-positive plasmids in hospital wastewater from Fuzhou, China: a single-centre, culture-independent, plasmid transmission study. Lancet Microbe. 2024 Jan;5(1):e13-e23. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00227-6

Информация о соавторах:

Борискина Елена Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Беляева Елена Вячеславовна, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Алексеева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Кряжев Дмитрий Валерьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией микробиологии ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Зайцева Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, директор ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Elena V. Boriskina, Junior Researcher at the Laboratory of Microbiology of Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor

Elena V. Belyaeva, Leading Researcher at the Laboratory of Microbiology of Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor

Anna E. Alekseeva, PhD in Biological Sciences, at the Laboratory of Metagenomics and Molecular indication of pathogens of Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor

Dmitry V. Kryazhev, PhD, DSc (Biological Sciences), Head of the laboratory-Leading Researcher at the Laboratory Microbiology of Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor

Natalia N. Zaitseva, MD, PhD, DSc, director of Academician I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor

Оценка способности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотическом субстрате в эксперименте

С.В.Титова, А.С.Анисимова, Н.В.Аронова

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

Стафилококки – условно-патогенные микроорганизмы, которые колонизируют органы и ткани здорового человека, образуя биопленки. Некоторые виды стафилококков имеют различные факторы патогенности и играют значительную роль в развитии патологических процессов.

Цель работы. Сравнительная оценка способности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах в эксперименте.

Материалы и методы. Исследованы штаммы разных видов *Staphylococcus*, выделенные от больных с внебольничной пневмонией. Формирование моно- и бинарных биопленок изучали на разных абиотических субстратах (полистирол и стекло), питательных средах согласно общепринятой и авторской методикам.

Результаты. Штаммы *S. aureus* и *S. haemolyticus* в ранние сроки (через сутки) образуют моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах. Биопленкообразование в бульонных средах (мясо-пептонный бульон и LB-бульон) было идентичным. Скорость размножения *S. aureus* выше, чем *S. haemolyticus*, с первых часов культивирования. Уменьшение степени биопленкообразования через 48 ч культивирования свидетельствует о возможном лизисе части популяции клеток и десорбции биопленки, в то же время продолжительная жизнеспособность (до 14 дней, срок наблюдения) *S. aureus* и *S. haemolyticus* свидетельствует о возможном сохранении их на медицинских объектах. Морфологические отличия биопленок *S. aureus*, связанные с формированием конгломератов, а также большая степень биопленкообразования подтверждает их патогенетическую особенность.

Заключение. С помощью двух бактериологических методов охарактеризовано биопленкообразование по его степени и морфологии биопленок, жизнеспособности стафилококков двух видов в моно- и бинарных биопленках. Способность к биопленкообразованию свидетельствует о возможном сохранении *S. aureus* и *S. haemolyticus* на медицинских объектах, включая катетеры, имплантаты, что наносит существенный урон здоровью человека.

Ключевые слова: *Staphylococcus*, биопленка, 96-луночные планшеты, покровные стекла

Для цитирования: Титова С.В., Анисимова А.С., Аронова Н.В. Оценка способности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотическом субстрате в эксперименте. Бактериология. 2025; 10(2): 50–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-50-59

Evaluation of the ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* strains to form mono- and binary biofilms on an abiotic substrate in an experiment

S.V.Titova, A.S.Anisimova, N.V.Aronova

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

Staphylococci are opportunistic microorganisms that colonize organs and tissues of healthy humans, forming biofilms. Some staphylococci species have different pathogenicity factors and play a significant role in the development of pathological processes.

The aim of the work is to comparatively evaluate the ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* strains to form mono- and binary biofilms on abiotic substrates in an experiment.

Materials and methods. Strains of different *Staphylococcus* species isolated from patients with community-acquired pneumonia were studied. The formation of mono- and binary biofilms was studied on different abiotic substrates (polystyrene and glass), nutrient media, according to generally accepted and original methods.

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 18.12.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Svetlana V. Titova, PhD, MD, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor

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

The article was received 18.12.2024, accepted for publication 30.06.2025

Results. *S. aureus* and *S. haemolyticus* strains form mono- and binary biofilms on abiotic substrates at early stages (after 24 hours). Biofilm formation in broth media (MPB and LB) was identical. The reproduction rate of *S. aureus* is higher than that of *S. haemolyticus* from the first hours of cultivation. A decrease in the degree of biofilm formation (BP) after 48 hours of cultivation indicates possible lysis of a part of the cell population and desorption of the biofilm, while long-term viability (up to fourteen days, observation period) of *S. aureus* and *S. haemolyticus* indicates their possible preservation at medical facilities. Morphological differences in *S. aureus* biofilms associated with the formation of conglomerates, as well as a high degree of biofilm formation confirm their pathogenetic feature.

Conclusion. Using two bacteriological methods, biofilm formation was characterized by the degree of BP and biofilm morphology, the viability of two types of staphylococci in mono- and polybiofilms. The ability to form biofilms indicates the possible preservation of *S. aureus* and *S. haemolyticus* on medical objects, including catheters, implants, which causes significant damage to human health.

Key words: *Staphylococcus*, biofilm, 96-well plates, cover glasses

For citation: Titova S.V., Anisimova A.S., Aronova N.V. Evaluation of the ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* strains to form mono- and binary biofilms on an abiotic substrate in an experiment. Bacteriology. 2025; 10(2): 50–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-50-59

Стафилококки являются возбудителями оппортунистических воспалительных заболеваний. Их относят к условно-патогенным микроорганизмам, которые колонизируют органы и ткани здорового человека, образуют биопленки. Некоторые виды характеризуются наличием факторов патогенности и при определенных условиях могут играть значительную роль в развитии различных патологических процессов. Более того, присутствие генов антибиотикорезистентности у стафилококков наносит колоссальный вред здравоохранению. Частота послеоперационных осложнений, вызванных метициллин-устойчивыми *Staphylococcus aureus*, достигает 33% [1, 2].

По способности коагулировать плазму крови стафилококки подразделяют на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки (КОС). Наиболее патогенным видом является золотистый стафилококк (*S. aureus*), принадлежащий к коагулазоположительной группе и обладающий широким набором факторов вирулентности, обеспечивающих ему адгезию, инвазию, формирование биопленок, продукцию токсинов, а также способствующих подавлению иммунного ответа человека [3–6]. *S. aureus* может вызывать пищевое отравление, пневмонию, менингит, остеомиелит, эндокардит, синдром токсического шока, сепсис, инфекции, обусловленные имплантированными медицинскими устройствами (с образованием на них биопленок), а также является частой причиной внутрибольничных инфекций, вызывая послеоперационные раневые инфекции [7–9].

КОС являются представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека, в частности, на 1 см² кожи здорового взрослого человека находится от 10 до 10⁵ колониеобразующих единиц (КОЕ) [10]. В то же время они могут быть причиной госпитальных (нозокомиальных) инфекций [11, 12]. Наиболее часто встречающиеся клинически значимые представители КОС – виды *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus* [13, 14]. Одним из важных факторов патогенности этих бактерий является способность создавать устойчивые биопленки на абиотических и биотических поверхностях [15–17], что создает трудности в лечении этих инфекций и опасность устойчивой контаминации ими медицинских приборов, инструментов и внутренней среды госпиталей [8, 18–22]. На сегодняшний день в инфекционной патологии человека возрастает роль *S. haemolyticus*, с которым ассоциируют такие инфекции, как

бактериемия, менингит, инфекции глаз, кожи, мочевыводящих путей и перитонит [23]. Более того, гемолитический стафилококк характеризуется высокой степенью антибиотикорезистентности, большинство его клинических изолятов устойчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов [24]. Во всех экологических нишах и в организме человека в основном встречаются смешанные биопленки, в которых выстраиваются взаимоотношения бактерий синергического или антагонистического поведения [25, 26]. В связи с повсеместным распространением полибиопленок взаимоотношения между бактериями приобретают синергический характер.

Цель работы – сравнительная оценка способности штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах в эксперименте.

Материалы и методы

Исследованы штаммы *S. aureus* (A4674, I9773) и *S. haemolyticus* (A399, 44760), выделенные из мокроты больных с внебольничными пневмониями в период 2020–2022 гг. на базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Культуры были изолированы в диагностически значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/мл) бактериологическим методом с помощью посева на питательные среды в соответствии с регламентирующими документами [27, 28].

Видовую идентификацию штаммов проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием масс-спектрометра Autoflexspeed III (BrukerDaltonics, Германия) и программного обеспечения MALDI Biotyper. Показатели полученных масс-спектров сравнивали с базой данных компании Bruker версия 3.1.66 (BrukerDaltonics, Германия). Значения Score 2,3–3,0 оценивали как высокую вероятность видовой идентификации. Подготовку образцов для исследования выполняли методом прямого нанесения материала на мишень в соответствии с инструкцией к прибору.

Формирование биопленок изучали на абиотических субстратах (полистирол и стекло), бульонных питательных средах (мясо-пептонный бульон (МПБ) и LB-бульон), исходная концентрация клеток стафилококков составляла 10⁷ КОЕ/мл. Согласно методу O'Tool G. et al. (2000), оценивали способ-

ность клеток *Staphylococcus* к адгезии на полистироловой поверхности планшета с окрашиванием их генцианвиолетом [29], бинарные биопленки состояли из смеси штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Для адгезии использовали плоскодонные 96-луночные полистироловые планшеты. Суспензии готовили из суточных агаровых культур по отраслевому стандарту мутности Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86П) или по показаниям прибора Densi-La-Meter. Далее с помощью последовательных 10-кратных разведений доводили до концентрации 10^7 КОЕ/мл, вносили по 200 мкл в полистироловые лунки планшета, измеряли исходную оптическую плотность (ОП), величина которой являлась стартовой. В качестве отрицательного контроля использовали лунки со стерильными питательными средами (МПБ и LB). Планшеты с экспериментальными и контрольными пробами культивировали в условиях влажной камеры при 37°C в течение 24 и 48 ч. Через 2, 4, 6, 24, 48 ч количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали на регистрирующем фотометре InfiniteF50 (Tecan, Австрия) при длине волны 620 нм и выражали в условных единицах ОП. Оценивали интенсивность прироста (ИП) бактериальной суспензии по формуле [30]:

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{24} : \text{ОП}_0,$$

где ОП_{24} – оптическая плотность суспензии бактерий через 24 ч культивирования,

ОП_0 – исходная оптическая плотность.

Значения ИП в контрольных средах были равны ≤ 1 . Интенсивность прироста оценивали следующим образом: если полученное значение ИП составляло от 1 до 2 – прирост отсутствовал, от 2 до 3 – незначительный/сомнительный, от 3 – высокий/значительный прирост.

Для определения способности штаммов формировать биопленку сначала определяли контрольное значение (ОПК), за которое принимали минимальное значение ОП контрольных лунок, превышение которого можно интерпретировать как способность к формированию биопленок (степень биопленкообразования). Для расчета использовали формулу [31]:

$$\text{ОПК} = M_{\text{cp}} (\text{ОП лунок контроля}) + 3 \times \sigma (\text{ОП лунок контроля}),$$

где M_{cp} – среднее арифметическое значение ОП контрольной лунки,

σ – среднее квадратичное (стандартное) отклонение контрольных значений.

На основании полученных на спектрофотометре данных для каждого штамма рассчитывали среднее арифметическое значение ОП. Оценивали степень биопленкообразования по значениям ОП окрашенного растворителя (спирт) согласно формуле [32]. При $\text{ОП} \geq 4$ ОПК биопленкообразование считали высоким; 2-4 ОПК – умеренным; ≤ 2 ОПК – низким; ≤ 1 ОПК – отсутствует.

Для визуализации биопленки использовали методы световой и люминесцентной микроскопии и покровные стекла, на которых адгезированные клетки *Staphylococcus* формировали биопленки. Жизнеспособность планктонной и биопленочной форм *Staphylococcus* учитывали по наличию роста на мясо-пептонном агаре (МПА) и молочном агаре. Для этого покровные стекла изымали из флаконов, удерживая их в вертикальном положении помещали на листы филь-

тровой бумаги, расположенные в чашке Петри, для удаления с поверхности оставшейся жидкости. После этого стекла накладывали на поверхность агара, отпечатывали с одной и другой стороны на агаровой пластине, оставляли в термостате при 37°C и на следующие сутки регистрировали наличие роста колоний, который свидетельствовал о жизнеспособности культуры. Второе стекло помещали на предметное стекло, добавляли раствор акридинового оранжевого в концентрации 20 мкг/мл (прижизненное флуорохромирование), накрывали покровным стеклом большего размера и исследовали методом люминесцентной микроскопии. Для световой микроскопии использовали фиксированные микропрепараты с двойным окрашиванием (Конго красным – 15 мин, затем генцианвиолетом – 10 мин) [33].

Все этапы работы с микроорганизмами проводили с соблюдением требований биологической безопасности согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ выполняли с использованием программы Medstatistica.ru. Полученные данные объединяли в вариационные ряды, на основании которых проводили расчет средних арифметических величин (M). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (σ). Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью критерия Стьюдента, при уровне значимости $p \leq 0,05$ достоверность считали значимой.

Результаты

В течение первых часов культивирования стафилококков в МПБ было отмечено нарастание концентрации штаммов *S. aureus* через 2 ч, а *S. haemolyticus* – через 4 ч. Через 6 ч концентрация клеток штаммов *S. aureus* превышала концентрацию *S. haemolyticus* примерно в 2 раза. При культивировании в LB-бульоне скорость размножения штаммов *S. aureus* через 6 ч примерно в 2 раза превышала *S. haemolyticus*, что выражалось в разных значениях динамики роста концентрации, представленной на рис. 1.

При культивировании в МПБ в течение 2 суток концентрации *S. aureus* и *S. haemolyticus* колебались в пределах значений ОП 0,35–0,41 и 0,23–0,31 соответственно; при культивировании в LB-бульоне концентрация клеток стафилококков была выше, чем в МПБ, значения ОП колебались в пределах 0,45–0,5 и 0,22–1,28 соответственно. При статистической обработке результатов различий между ИП концентрации *S. aureus* и *S. haemolyticus* в МПБ и LB-бульоне за 24 ч не выявлены ($t_{\text{st}} = 0,0$; $p = 1,000$; $t_{\text{st}} = 1,04$; $p = 0,326$).

Через 48 ч во всех экспериментальных пробах концентрация клеток штаммов *Staphylococcus* разных видов была от 0,2 до 0,78 ОП, соответственно показатель ИП был >3 (табл. 1), что соответствовало значительной степени интенсивности прироста концентрации стафилококков в отличие от контрольных проб, концентрация клеток которых составляла 0,05 ОП и не менялась в течение периода наблюдения. Было отмечено незначительное колебание концентраций *Staphylococcus* в пробах на МПБ. Так, концентрация клеток двух штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* A399 незначительно уменьшалась, в пробе со штаммом *S. haemolyticus* 44760, наоборот, отмече-

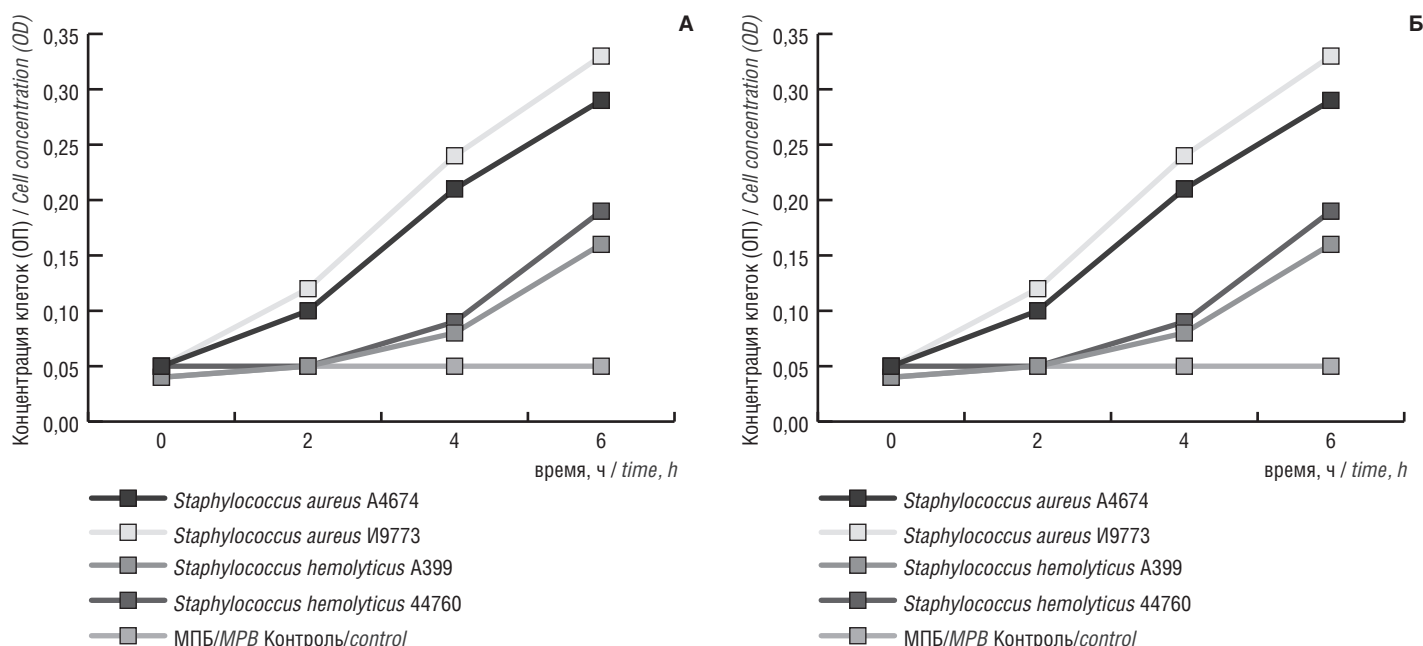


Рис. 1. Динамика нарастания концентрации клеток *S. aureus* и *S. haemolyticus* в первые часы культивирования в МПБ (А) и LB-бульоне (Б).

Fig. 1. Dynamics of increase in the concentration of *S. aureus* and *S. haemolyticus* cells in the first hours of cultivation in MPB (A) and LB broths (B).

но увеличение его концентрации. В пробах, культивируемых в LB-бульоне, концентрация клеток штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* 44760 незначительно увеличилась. В то же время в пробах со штаммом *S. haemolyticus* A399 отмечено

снижение концентрации клеток (рис. 1). Таким образом, отмечена большая концентрация клеток стафилококков в пробах при культивировании в LB-бульоне по сравнению с пробами, культивируемыми в МПБ, за 48 ч культивирования. Однако

Таблица 1. Средняя концентрация клеток штаммов *Staphylococcus* разных видов в питательных средах – МПБ и LB-бульоне – через 24 и 48 ч

Table 1. Average concentration cells of *Staphylococcus* strains of different species in nutrient media – MPB and LB broth after 24 and 48 hours

	Рост бактерий в питательных средах (ОП) / Bacterial growth in nutrient media (OD)									
	МПБ / MPB					LB				
	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		Контроль / Control	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		Контроль / Control
	A 4674	I 9773	A 399	44760	МПБ MPB	A 4674	I 9773	A 399	44760	LB
0 ч роста / 0 h of growth	0,05 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,0	0,05	0,05 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04
24 ч роста / 24 h of growth	0,35 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,05	0,5 ± 0,07	0,45 ± 0,05	1,28 ± 0,14	0,22 ± 0,0	0,04
Степень ИП / Degree of GR	7,0 Значительная / significant	8,2 Значительная / significant	6,2 Значительная / significant	4,6 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence	10,0 Значительная / significant	11,25 Значительная / significant	32,0 Значительная / significant	5,5 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence
48 ч роста / 28 h of growth	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,321 ± 0,02	0,05	0,57 ± 0,11	0,51 ± 0,08	0,78 ± 0,15	0,34 ± 0,16	0,04
Степень ИП / Degree of GP	6,4 Значительная / significant	6,4 Значительная / significant	5,0 Значительная / significant	6,4 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence	11,4 Значительная / significant	12,75 Значительная / significant	19,5 Значительная / significant	8,5 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence

ИП = ОП24(48)/ОП0; 1 – отсутствовал прирост; 1–2 – слабый; >2 – значительный. / GR (growth rate) = OD24(48)/OD0; 1 – no growth; 1–2 – weak; >2 – significant.

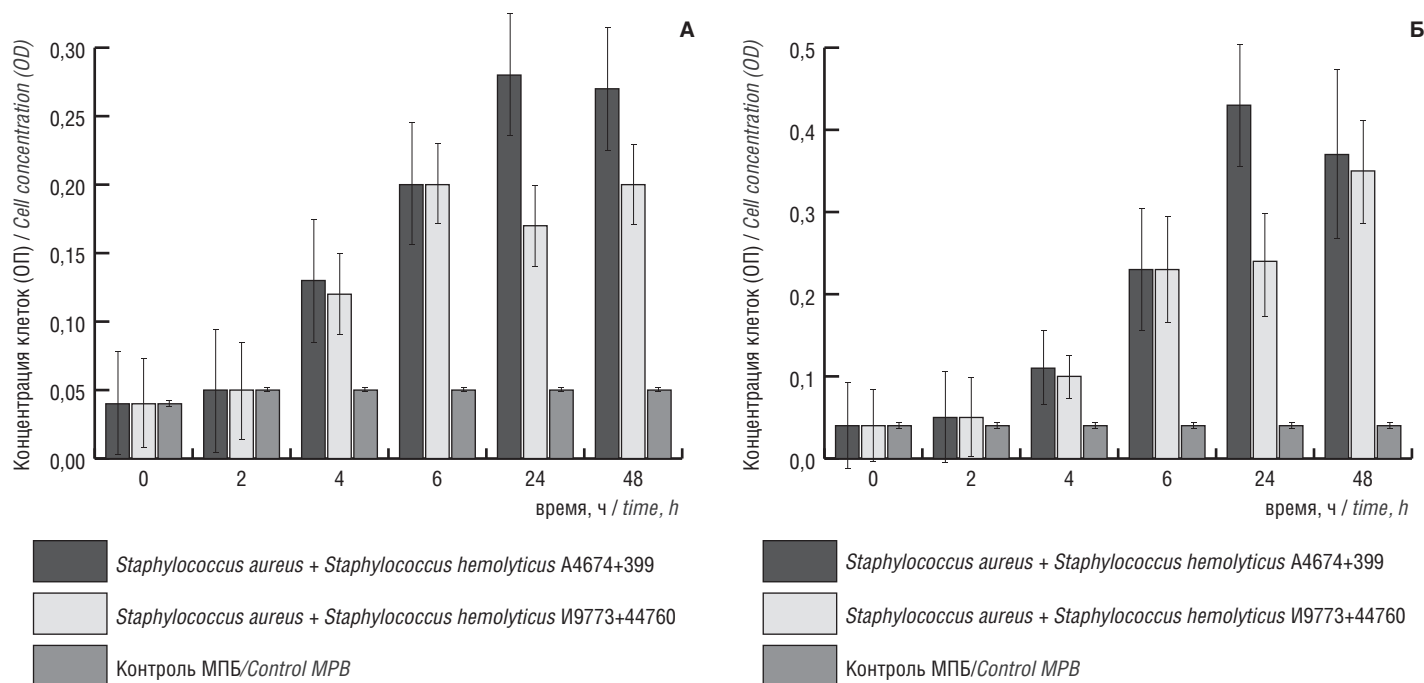


Рис. 2. Динамика нарастания концентрации клеток смеси *S. aureus* и *S. haemolyticus* в МПБ (А) и LB-бульоне (В).
Fig. 2. Dynamics of the increase in the concentration of cells of a mixture of *S. aureus* and *S. haemolyticus* in MPB (A) and LB broths (B).

при таком колебании концентрации после статистической обработки результатов различия между ИП концентрации *S. aureus* и *S. haemolyticus* в МПБ и LB-бульоне через 48 ч не выявлены ($t_{st} = 0,24$; $p = 0,818$; $tSt = 0,32$; $p = 0,759$).

При совместном культивировании двух стафилококков разных видов в одной пробе в МПБ и LB-бульоне (рис. 2) происходило динамичное увеличение концентрации клеток в течении 24 ч. Через сутки суммарная концентрация клеток двух стафилококков (по данным ОП) в пробе колебалась в пределах 0,18–0,28 и 0,24–0,42 при культивировании в МПБ и LB-бульоне соответственно. В то же время отмечен незна-

чительный спад концентрации в пробе со штаммами *S. aureus* I9773 и *S. haemolyticus* 44760 после культивирования в МПБ к 24 ч с последующим подъемом. Через 48 ч от начала культивирования суммарная концентрация клеток стафилококков в паре *S. aureus* A4674 и *S. haemolyticus* 399 снижалась до значений 0,28 ОП (МПБ) и 0,38 ОП (LB), в паре *S. aureus* I9773 и *S. haemolyticus* 44760 – продолжала повышаться, но не превысила концентрацию первой пары.

При совместном культивировании штаммов стафилококков разных видов в одной пробе скорость их размножения в LB-бульоне превышала таковую в МПБ.

Таблица 2. Оценка способности биопленкообразования на поверхности пластика штаммами *S. aureus* и *S. haemolyticus*
Table 2. Evaluation of the ability of biofilm formation on the surface of plastic by strains of *S. aureus* and *S. haemolyticus*

	Оценка биопленкообразования / Assessment of biofilm formation									
	МПБ /MPB					LB				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	Контроль / Control			<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	Контроль / Control		
	A4674	I9773	A399	44760		A4674	I9773	A399	44760	LB
24 ч роста, ОП / 24 h of growth, OD	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,1	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Умеренная / moderate	Умеренная / moderate	Низкая / low	Низкая / low		Умеренная / moderate	Умеренная / moderate	Низкая / low	Низкая / low	
48 ч роста, ОП / 48 h of growth, OD	0,06 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,0	0,15 ± 0,02	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Низкая / low	Низкая / low	Низкая / low	Низкая / low		Низкая / low	Низкая / low	Низкая / low	Умеренная / moderate	

1) СтБП – степень биопленкообразования; 2) ОПк = $\text{ХсрОПк} + 3\text{хСГПк}$; где СГПк – среднееквадратичное отклонение;
3) ОП ≤ ОПк – отсутствует; ОПк < ОП ≤ 2ОПк – низкая; 2ОПк < ОП ≤ 4ОПк – умеренная; ОП > 4ОПк – значительная;
1) BFD – degree of biofilm formation; 2) ODc = $M \text{ ODc} + 3 \times \sigma$; σ – standard deviation
3) OD ≤ ODc – absent; ODc < OD ≤ 2ODc – low; 2ODc < OD ≤ 4ODc – moderate; OD > 4ODc – significant.

Таблица 3. Оценка способности штаммов формировать бинарные биопленки на поверхности пластика
Table 3. Evaluation of the ability of strains to form binary biofilms on the surface of plastic

	МПБ / MPB			LB		
	<i>S. aureus</i> + <i>S. haemolyticus</i>			<i>S. aureus</i> + <i>S. haemolyticus</i>		
	A4674 + A399	I9773 + 44760	Контроль / Control	A4674 + A399	I9773 + 44760	Контроль / Control
24 ч роста / 24 h of growth	0,14 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,1	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,0	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Умеренная / moderate	Низкая / low		Низкая / low	Низкая / low	
48 ч роста / 48 h of growth	0,05 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,0	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Низкая / low	Низкая / low		Низкая / low	Низкая / low	

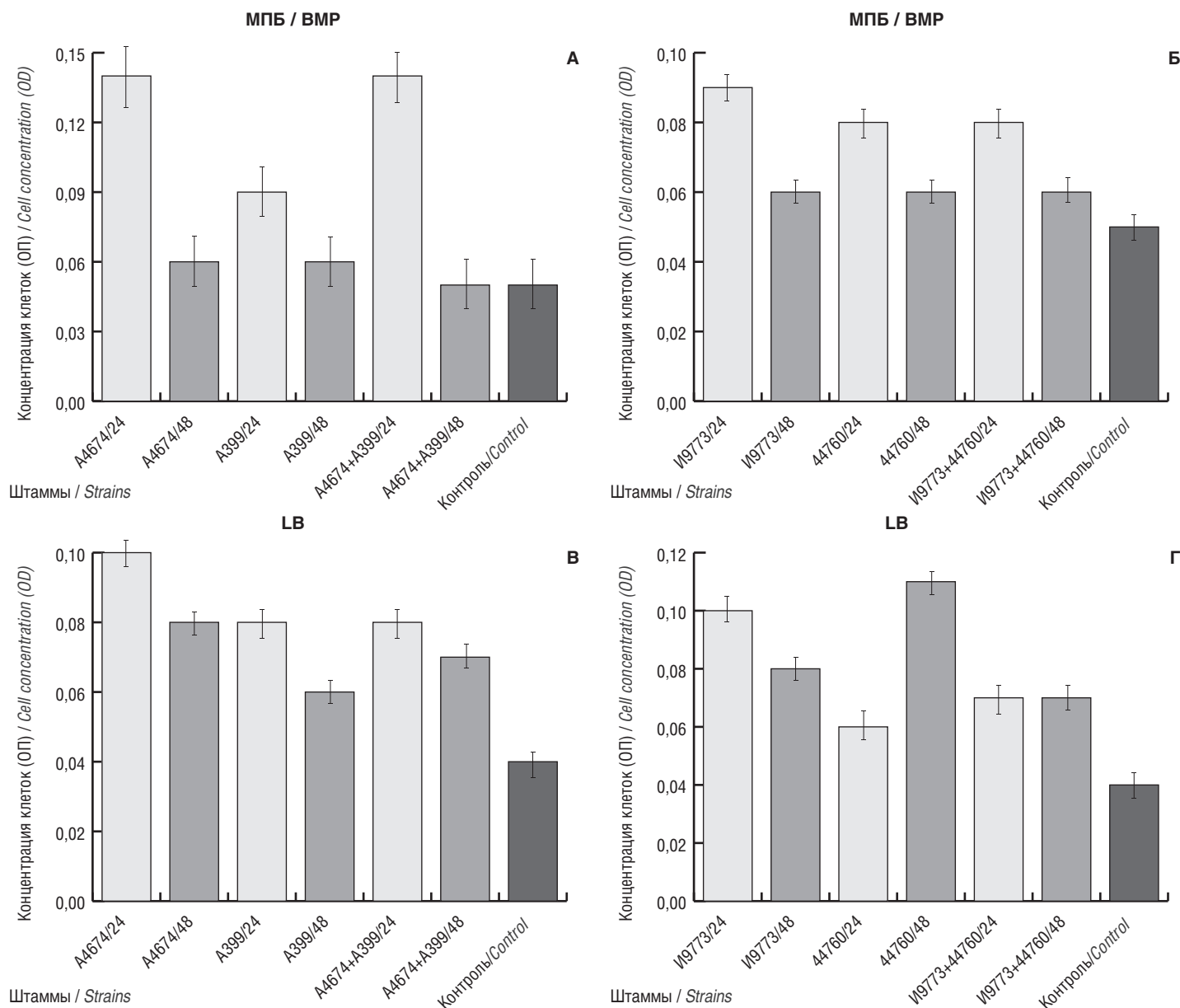


Рис. 1. Динамика нарастания концентрации клеток *S. aureus* и *S. haemolyticus* в первые часы культивирования в МПБ (А) и LB-бульоне (Б).

Fig. 1. Dynamics of increase in the concentration of *S. aureus* and *S. haemolyticus* cells in the first hours of cultivation in MPB (A) and LB broths (B).

При изучении процесса биопленкообразования были использованы те же планшеты с экспериментальными и контрольными пробами, в которых изучали интенсивность роста планктонных форм в МПБ и LB-бульоне через 24 и

48 ч культивирования. По истечении времени определяли показатели ОП образовавшихся биопленок на дне лунок планшета, после пересчета по формуле была определена степень биопленкообразования (табл. 2).

Все штаммы стафилококков, культивируемые в бульонных средах в 96-луночном пластиковом планшете, образовали биопленки через сутки, однако штаммы *S. aureus* имели умеренную, а штаммы *S. haemolyticus* – низкую степень биопленкообразования (табл. 2). Представленные табличные результаты статистически подтверждены значимой связью ($t_{SI} = 3,00$; $p = 0,030$). Через 48 ч культивирования проб на полистироловой панели при 37°C показатели степени биопленкообразования уменьшились. Практически во всех пробах ОП концентрации клеток стафилококков в биопленках через 24 ч была выше, чем через 48 ч культивирования, что, вероятно, связано с десорбцией клеток штаммов *Staphylococcus* из биопленки и переходом их в планктонную культуру. Исключение составил один штамм *S. haemolyticus* 44760, который наиболее активно образовывал биопленку через 48 ч при культивировании в LB-бульоне, ОП биопленкообразования была в 2 раза выше, чем через 24 ч. Обращает внимание (табл. 1), что ИП концентрации планктонных клеток у этого штамма в МПБ и LB-бульоне была ниже, чем у других штаммов.

При совместном культивировании двух штаммов в одной пробе через сутки показатели ОП бинарных биопленок соответствовали показателям ОП при культивировании монобиопленок этих штаммов или были ниже. Степень биопленкообразования через 24 ч в одной паре штаммов была умеренная, в трех – низкая, результаты представлены в табл. 3. Через 48 ч ОП биопленочных проб снизилась.

На рис. 3 представлена сравнительная оценка способности штаммов *Staphylococcus* формировать моно- и бинарные биопленки на пластиковом субстрате при культивировании в МПБ и LB-бульоне.

Как видно из рис. 3, наиболее активно образовывал биопленку штамм *S. aureus* A 4674: за 24 ч при культивировании в МПБ (рис. 3А) его ОП превышала ОП контрольной пробы в 2,8 раза, так же и концентрация бинарной биопленки (*S. aureus* A 4674 и *S. haemolyticus* A399) превышала контрольную. При этом концентрации клеток в моно- и бинарной биопленках были одинаковыми. Через 48 ч ОП клеток в бинарной биопленке была ниже, чем в монобиопленках каждого штамма. В экспериментах с этой же парой штаммов при культивировании в LB-бульоне биопленкообразование было ниже, чем в МПБ. В бинарной биопленке концентрация клеток пары *Staphylococcus* (A 4674 и A 399) через 24 ч была на уровне ОП штамма *S. haemolyticus* A 399 в монобиопленке и ниже, чем у *S. aureus* A 4674. Через 48 ч концентрация клеток в бинарной биопленке этих культур снизилась. Другая пара штаммов при культивировании в МПБ в течение 24 ч также образовала бинарную биопленку с концентрацией клеток на уровне *S. haemolyticus* 44760, но ниже, чем концентрация *S. aureus* И 9773 в монобиопленках. Через 48 ч концентрация клеток в бинарной биопленке снизилась, была такой же, как в монобиопленках этих штаммов. При культивировании в LB-бульоне штамм *S. haemolyticus* 44760 через 48 ч активно образовал биопленку, его ОП стала выше контрольного значения в 2,75 раза и в 1,8 раза выше, чем через 24 ч. Однако при формировании бинарной биопленки концентрация клеток *Staphylococcus* была ниже, чем их концентрация в монобиопленках.

Все биопленки *S. aureus* и *S. haemolyticus* сохраняли свою жизнеспособность на протяжении 2 нед. (срок наблюдения)

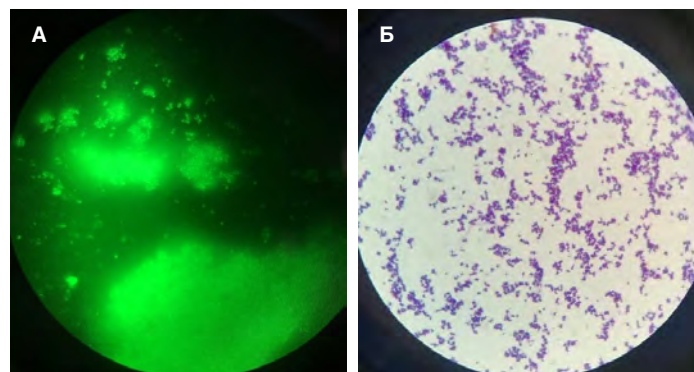


Рис. 4. Монобиопленка *S. haemolyticus* 44760.
 Fig. 4. Monobiofilm *S. haemolyticus* 44760.

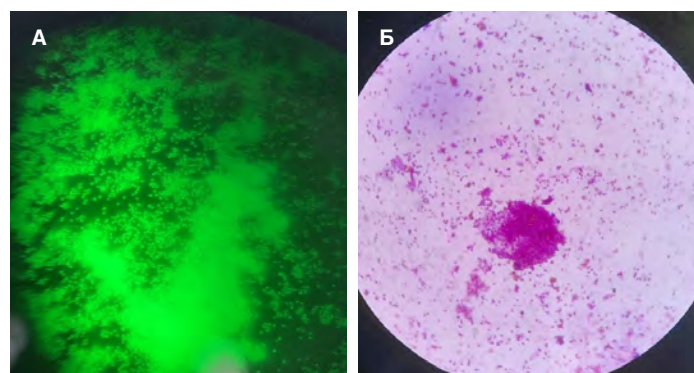


Рис. 5. Монобиопленка *S. aureus* 4674.
 Fig. 5. *S. aureus* 4674 monobiofilm.

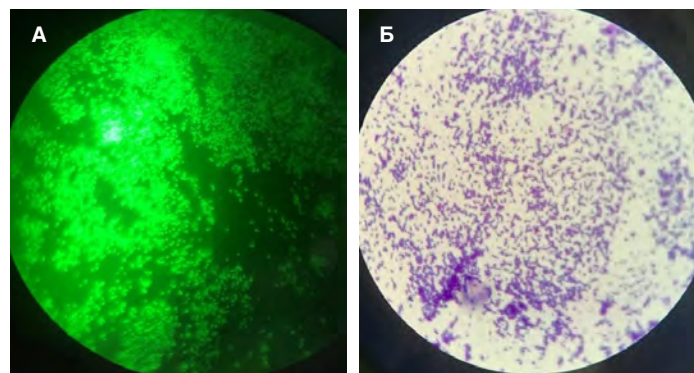


Рис. 6. Бинарная биопленка *S. aureus* 9773 и *S. haemolyticus* 44760, субстрат – покровное стекло, увеличение 90 × 100.
 Fig. 6. Binary biofilm of *S. aureus* 9773 and *S. haemolyticus* 44760, cover glass substrate, magnification 90 × 100.

Примечание к рис. 4–6: А) клетки *Staphylococcus* окрашены акридиновым оранжевым; Б) окрашены конго красным с генцианвиолетом; увеличение 10 × 900.

Note to Fig. 4–6: A) *Staphylococcus* cells stained with acridine orange; B) stained with Congo red and gentian violet; magnification 10 × 900.

и имели характерный рост на МПА и молочном агаре. При визуализации нативных и фиксированных моно- и бинарных биопленок (рис. 4, 5), образованных на абиотическом субстрате (покровные стекла), обнаружены небольшие отличия.

На рис. 4, 5 продемонстрированы монобиопленки штаммов *S. haemolyticus* и *S. aureus*. Визуализацию объемной картины биопленок с поднимающимися вверх и образующими конгломераты разных размеров клетками стафилококков помогает осуществить использование микровинта микроскопа, при просмотре одного поля зрения. Обращают на себя внимание размеры скоплений клеток: в биопленках у *S. haemolyticus* они разных размеров – от небольших до

крупных, как на рис. 4А у штамма № 44760, для биопленок *S. aureus* характерны большие размеры скоплений во всех полях зрения, также просматриваются промежутки в виде дорожек между скоплениями клеток. Биопленки в фиксированных микропрепаратах представлены небольшими скоплениями клеток во всех полях зрения, характерными для штаммов обоих видов стафилококков (рис. 4Б, 5Б). В то же время у штамма *S. aureus* встречаются единичные большие агрегаты клеток (рис. 5Б). Бинарные биопленки, представленные на рис. 6, образованные *S. aureus* и *S. haemolyticus*, напоминают картину монобиопленок, образованных *S. aureus*, также состоят из больших скоплений клеток во всех полях зрения с промежутками в виде дорожек.

Обсуждение

Формирование биопленок стафилококков в бульонных средах (МПБ и LB) при температуре 37°C происходило за одни сутки. Отличий в биопленкообразовании штаммов *Staphylococcus* на разных питательных средах не обнаружено, различия статистически не значимы. Изученные штаммы стафилококков имели значительную степень интенсивности прироста концентрации за 24 ч, однако степень биопленкообразования у них была разной. При культивировании в МПБ и LB-бульоне ИП концентрации *S. aureus* была достаточной для формирования биопленок, подтверждением является статистически значимая связь ($t_{st} = 5,38$; $p = 0,117$ и $t_{st} = 13,86$; $p = 0,045$ соответственно). ИП концентрации *S. haemolyticus* также была значительной, однако недостаточной для формирования биопленки ($t_{st} = 3,50$; $p = 0,177$ и $t_{st} = 0,93$; $p = 0,522$ соответственно). Возможно, стадия адгезии клеток к лункам пластикового планшета была непрочной и клетки легко отмывались от пластикового субстрата, а также имел место лизис части популяции клеток [34, 35]. Вероятно, на процесс биопленкообразования влияет скорость размножения, которая у штаммов *S. aureus* заметно выше с первых часов культивирования в отличие от *S. haemolyticus*. В совместных пробах с двумя штаммами интенсивность прироста была значительной, однако к более активному формированию биопленок по сравнению с монобиопленками это не привело и степень биопленкообразования была даже немного ниже, что, вероятно, обусловлено межвидовыми взаимоотношениями. Обращает на себя внимание визуальная схожесть картины в микропрепаратах бинарных биопленок в полях зрения с монобиопленками. Вероятно, скорость размножения и адгезия клеток одного из штаммов к пластиковому субстрату позволяли ему быть более активным при формировании биопленки. В других пробах совместное культивирование двух штаммов приводило к интенсивному росту обоих штаммов, но прочной адгезии к пластиковым лункам планшета не произошло. Изменение в степени биопленкообразования в сторону уменьшения через 48 ч культивирования во всех пробах может свидетельствовать о десорбции биопленки и выходе части клеток из биопленочной в планктонную форму, а также лизисе небольшой части популяции клеток [34, 35]. Исключение – штамм *S. haemolyticus* 44760, у которого скорость размножения в первые часы и интенсивность прироста концентрации в двух бульонных средах были низкими,

поэтому степень БП через 48 ч выше, чем через 24 ч культивирования. При образовании биопленок все микроорганизмы, включая и стафилококки, делятся на быстро и медленно образующие, и даже на небольшой выборке штаммов продемонстрировано, что скорость образования биопленки у *S. aureus* заметно выше, чем у *S. haemolyticus*. При визуализации нативных и фиксированных микропрепаратов биопленки, образованные *S. aureus*, состояли из скоплений клеток больших размеров во всех полях зрения, в отличие от более скудной картины штаммов *S. haemolyticus*. Вероятно, поэтому в микропрепаратах бинарных биопленок визуализированы скопления клеток, свойственные *S. aureus*, во всех полях зрения. Все биопленки *S. aureus* и *S. haemolyticus* сохраняли свою жизнеспособность в течение 2 нед. (срок наблюдения). В дальнейшем на большей выборке штаммов с использованием микроскопических и молекулярно-генетических методов нам удастся более точно определить эти различия и состав полибиопленок.

Заключение

С помощью различных бактериологических методов охарактеризована морфология биопленок, жизнеспособность стафилококков двух видов в моно- и бинарных биопленках. Таким образом, при использовании двух бактериологических методик с оценкой степени биопленкообразования и жизнеспособности биопленок установлено, что стафилококки, выделенные из мокроты больных с внебольничной пневмонией, обладают высокой скоростью размножения и способны в течение короткого времени образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах. Такая способность свидетельствует о возможном сохранении *S. aureus* и *S. haemolyticus* на медицинских объектах, включая катетеры, имплантаты, что наносит существенный урон здоровью человека.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Financial support

The work was carried out within the framework of the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Gurusamy KS, Koti R, Toon CD, Wilson P, Davidson BR. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Aug 20;(8):CD009726. DOI: 10.1002/14651858.CD009726.pub2
2. Chen L, Wang Z, Xu T, Ge H, Zhou F, Zhu X, et al. The Role of graRS in Regulating Virulence and Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Front. Microbiol. 2021;12:727104. DOI: 10.3389/fmicb.2021.727104
3. Pottinger PS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Medical Clinics of North America. 2013;97(4):601-619. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.02.005

4. Power Coombs MR, Kronforst K, Levy O. Neonatal host defense against staphylococcal infections. Clin Dev Immunol. 2013 Jul 10;2013:826303. DOI: 10.1155/2013/826303
5. Маянский АН, Чеботарь ИВ. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;1:101-108.
6. Ярец ЮИ. Патогенный потенциал бактерий группы ESKAPE, выделенных из ран: характеристика фено- и генотипических маркеров и возможность их практического применения. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022;20(4):400-413. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413
7. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput Struct Biotechnol J. 2020 Nov 4;18:3324-3334. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.027
8. Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, et al. Redundant and Distinct Roles of Secreted Protein Eap and Cell Wall-Anchored Protein SasG in Biofilm Formation and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2019 Mar 25;87(4):e00894-18. DOI: 10.1128/IAI.00894-18
9. Ермоленко ЗМ, Слукин ПВ, Фурсова НК. Биопленки микроорганизмов в урологии: клиническая значимость и контроль связанных с ними инфекций. Бактериология. 2021;6(2):47-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-47-61
10. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am. 2009 Mar;23(1):73-98. DOI: 10.1016/j.idc.2008.10.001
11. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994 Aug;19(2):231-43; quiz 244-5. DOI: 10.1093/clinids/19.2.231
12. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
13. Davidson LE, Boucher HW. Infections in immunocompromised patients. In: Staphylococci in Human Disease. Eds Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Fowler VG Jr. 2nd Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2009;505-20.
14. Montelongo C, Mores CR, Putonti C, Wolfe AJ, Abouelfetouh A. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* Clinical Isolates from Egypt. MicrobiolSpectr. 2022 Aug 31; 10(4):e0241321. DOI: 10.1128/spectrum.02413-21
15. Божкова СА, Краснова МВ, Полякова ЕМ, Рукина АН, Шабанова ВВ. Способность к формированию биопленок у клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* – ведущих возбудителей ортопедической имплантат-ассоциированной инфекции. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014;2(16):149-56.
16. Бабушкина ИВ, Бондаренко АС, Мамонова ИА, Ульянов ВЮ. Образование биопленок штаммами стафилококка, выделенными из различного биологического материала при инфекционных осложнениях тотального эндопротезирования коленного сустава. Саратовский научно-медицинский журнал. 2019;15(2):261-266.
17. Корниенко МА, Копыльцов ВН, Шевлягина НВ, Диденко ЛВ, Любасовская ЛА, Припутневич ТВ, и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016;1:18-25. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-18-25
18. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. mBio. 2012 Jul 31;3(4):e00198-12. DOI: 10.1128/mBio.00198-12
19. Jin Y, Guo Y, Zhan Q, Shang Y, Qu D, Yu F. Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Upregulating cidA. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3):e01912-19. DOI: 10.1128/AAC.01912-19
20. Пономаренко СВ. Микробиологические аспекты стафилококковой инфекции на современном этапе (обзор литературы). Анналы Мечниковского института. 2013;3:13-17.
21. Chopra S, Harjai K, Chhibber S. Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. J Antibiot (Tokyo). 2015 Jan;68(1):15-22. DOI: 10.1038/ja.2014.96
22. Осипова ЕВ, Шипицына ИВ, Науменко ЗС. Сравнительная количественная оценка способности образования биопленки различными клиническими штаммами бактерий на поверхности полистирола и стекла. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014;8:55-58.
23. Manoharan M, Sistla S, Ray P. Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. Microb Drug Resist. 2021 Apr; 27(4):501-508. DOI: 10.1089/mdr.2019.0395
24. Eltwisy HO, Twisy HO, Hafez MH, Sayed IM, El-Mokhtar MA. Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. Microorganisms. 2022 May 31;10(6):1130. DOI: 10.3390/microorganisms10061130
25. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva [Text]. S. Periasamy. Infect Immun. 2009;77(9):3542-3551.
26. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors [Text]. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(5):990-1004.
27. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания МУК 4.2.3115-13. М., 2013.
28. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии: Методические рекомендации МР 4.2.0114-16. М., 2016.
29. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
30. Савилов ЕД, Маркова ЮА, Немченко УМ, Носкова ОА, Чemezova НН, Кунгурцева ЕА, и др. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. Тихоокеанский медицинский журнал. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35
31. Ярец ЮИ, Шевченко НИ. Новый метод анализа бактериальной биопленки. Наука и инновации. 2016;11(156):68-72.
32. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
33. Титова СВ, Веркина ЛМ. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241
34. Sadykov MR, Bayles KW. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. Curr Opin Microbiol. 2012 Apr;15(2):211-5. DOI: 10.1016/j.mib.2011.12.010
35. Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, et al. Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. Pathog Dis. 2014 Apr;70(3):414-22. DOI: 10.1111/2049-632X.12158

References

1. Gurusamy KS, Koti R, Toon CD, Wilson P, Davidson BR. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Aug 20;(8):CD009726. DOI: 10.1002/14651858.CD009726.pub2
2. Chen L, Wang Z, Xu T, Ge H, Zhou F, Zhu X, et al. The Role of graRS in Regulating Virulence and Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Front. Microbiol. 2021;12:727104. DOI: 10.3389/fmicb.2021.727104

3. Pottinger PS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Medical Clinics of North America. 2013;97(4):601-619. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.02.005
4. Power Coombs MR, Kronforst K, Levy O. Neonatal host defense against staphylococcal infections. Clin Dev Immunol. 2013 Jul 10;2013:826303. DOI: 10.1155/2013/826303
5. Mayansky AN, Chebotar IV. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011;1:101-108. (In Russian).
6. Yarets Yul. Pathogenic potential of ESKAPE group bacteria isolated from wounds: characterization of phenotypic and genotypic markers and possibility of their practical application. Journal of the Grodno State Medical University. 2022;20(4):400-413. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413 (In Russian).
7. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput Struct Biotechnol J. 2020 Nov 4;18:3324-3334. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.027
8. Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, et al. Redundant and Distinct Roles of Secreted Protein Eap and Cell Wall-Anchored Protein SasG in Biofilm Formation and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2019 Mar 25;87(4):e00894-18. DOI: 10.1128/IAI.00894-18
9. Ermolenko ZM, Slukin PV, Fursova NK. Microbial biofilms in urology: clinical significance and control of associated infections. Bacteriology. 2021;6(2):47-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-47-61 (In Russian).
10. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am. 2009 Mar;23(1):73-98. DOI: 10.1016/j.idc.2008.10.001
11. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994 Aug;19(2):231-43; quiz 244-5. DOI: 10.1093/clinids/19.2.231
12. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
13. Davidson LE, Boucher HW. Infections in immunocompromised patients. In: Staphylococci in Human Disease. Eds Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Fowler VG Jr. 2nd Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2009;505-20.
14. Montelongo C, Mores CR, Putonti C, Wolfe AJ, Abouelfetouh A. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* Clinical Isolates from Egypt. MicrobiolSpectr. 2022 Aug 31; 10(4):e0241321. DOI: 10.1128/spectrum.02413-21
15. Bozhkova SA, Krasnova MV, Polyakova EM, Rukina AN, Shabanova VV. Biofilm formation by clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* in prosthetic joint infection. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2014;2(16):149-56. (In Russian).
16. Babushkina IV, Bondarenko AS, Mamonova IA, Uljanov VJ. Biofilm formation by *Staphylococcus* strains isolated from various biological materials at infectious complications following total knee replacement. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2019;15(2):261-266. (In Russian).
17. Kornienko MA, Kopyltsov VN, Ilina EN, Shevlyagina NV, Didenko LV, Lyubasovskaya LA, et al. The ability of various strains of *Staphylococcus* to create biofilms and their effect on cells of the human body. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2016;1:18-25. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-18-25 (In Russian).
18. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. mBio. 2012 Jul 31;3(4):e00198-12. DOI: 10.1128/mBio.00198-12
19. Jin Y, Guo Y, Zhan Q, Shang Y, Qu D, Yu F. Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Upregulating *cidA*. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3):e01912-19. DOI: 10.1128/AAC.01912-19
20. Ponomarenko SV. Mikrobiologicheskie aspekty stafilocokkovoi infektsii na sovremennom etape (obzor literatury). Annali Mechnikovskogo instituta. 2013;3:13-17. (In Russian).
21. Chopra S, Harjai K, Chhibber S. Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. J Antibiot (Tokyo). 2015 Jan;68(1):15-22. DOI: 10.1038/ja.2014.96
22. Osipova EV, Shipitsyna IV, Naumenko ZS. A comparative quantitative evaluation of the potential of biofilm formation by different bacterial clinical strains on polystyrene and glass surface. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2014;8:55-58. (In Russian).
23. Manoharan M, Sistla S, Ray P. Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. Microb Drug Resist. 2021 Apr; 27(4):501-508. DOI: 10.1089/mdr.2019.0395
24. Eltwisy HO, Twisy HO, Hafez MH, Sayed IM, El-Mokhtar MA. Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. Microorganisms. 2022 May 31;10(6):1130. DOI: 10.3390/microorganisms10061130
25. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva [Text]. S. Periasamy. Infect Immun. 2009;77(9):3542-3551.
26. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors [Text]. FEMS Microbiol. Rev. 2012;36(5):990-1004.
27. Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnykh pnevmonii: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.3115-13. M., 2013. (In Russian).
28. Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnoi pnevmonii pnevmokokkovoi etiologii: Metodicheskie rekomendatsii MR 4.2.0114-16. M., 2016. (In Russian).
29. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
30. Savilov ED, Markova YA, Nemchenko UM, Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, et al. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. Pacific Medical Journal. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35 (In Russian).
31. Yarets Yul, Shauchenka NI. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. Наука и инновации. 2016;11(156):68-72. (In Russian).
32. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
33. Titova SV, Verkina LM. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241 (In Russian).
34. Sadykov MR, Bayles KW. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. Curr Opin Microbiol. 2012 Apr;15(2):211-5. DOI: 10.1016/j.mib.2011.12.010
35. Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, et al. Temporal expression of *agrB*, *cidA*, and *alsS* in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. Pathog Dis. 2014 Apr;70(3):414-22. DOI: 10.1111/2049-632X.12158

Информация о соавторах:

Анисимова Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Аронова Надежда Валентиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Anastasia S. Anisimova, Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор

Nadezhda V. Aronova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор

Молекулярно-генетический анализ штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в Донецкой Народной Республике в 2022–2023 гг.

А.М.Горох, А.С.Водопьянов, А.А.Герасименко, Р.В.Писанов

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

В работе изучено генетическое разнообразие штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в Донецкой Народной Республике в 2022–2023 гг. из клинического материала, продуктов питания и объектов окружающей среды. Для изучения штаммов было проведено полногеномное секвенирование исследуемых культур с применением биоинформационного анализа авторскими и сторонними программами. В ходе работы выделено и изучено 29 штаммов *S. enterica*, отличающихся по серотипам, INDEL-, SNP-, плазмидным профилям, наличию/отсутствию генов патогенности. Проведен SNP-анализ с построением филогенетического дерева изученных изолятов. Это, в свою очередь, позволило оценить циркуляцию штаммов различных серотипов *S. enterica*.

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, генотипирование, гены вирулентности, плазмидный состав, INDEL, SNP-анализ, минимальное связующее дерево

Для цитирования: Горох А.М., Водопьянов А.С., Герасименко А.А., Писанов Р.В. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в Донецкой Народной Республике в 2022–2023 гг. Бактериология. 2025; 10(2): 60–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-60-66

Molecular genetic analysis of *Salmonella enterica* strains isolated in the Donetsk People's Republic in 2022–2023

A.M.Gorokh, A.S.Vodopyanov, A.A.Gerasimenko, R.V.Pisanov

Federal State Institution Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

This paper investigates the genetic diversity of *Salmonella enterica* strains isolated in the Donetsk People's Republic between 2022 and 2023 from clinical specimens, food products, and environmental samples. Whole-genome sequencing was performed on the studied cultures using bioinformatics analysis with both author-developed and commercially available software. During this study, 29 *S. enterica* strains were isolated and characterized, exhibiting variation in serotypes, INDELs, SNPs, plasmid profiles, and the presence or absence of pathogenicity genes. SNP analysis facilitated the construction of a phylogenetic tree for the studied isolates. This tree allowed for an assessment of the circulation patterns of various *S. enterica* serotypes.

Key words: *Salmonella enterica*, genotyping, virulence genes, plasmid composition, INDEL, SNP analysis, minimum spanning tree

For citation: Gorokh A.M., Vodopyanov A.S., Gerasimenko A.A., Pisanov R.V. Molecular genetic analysis of *Salmonella enterica* strains isolated in the Donetsk People's Republic in 2022–2023. Bacteriology. 2025; 10(2): 60–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-60-66

Сальмонеллез представляет собой острое зооантропонозное инфекционное заболевание, при котором возбудитель передается фекально-оральным путем; основными проявлениями сальмонеллеза являются поражение пищеварительного тракта, обезвоживание и интоксикация. Болезнь часто сопровождается тяжелым течением и требует госпитализации [1]. Сальмонеллез сохраняет свою актуальность при формировании крупных вспышек и занимает третье место в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-

оральным механизмом передачи инфекции. Микроорганизмы рода *Salmonella* лидируют как возбудители вспышек, вызванных употреблением контаминированных пищевых продуктов, которые нередко затрагивают множество административных территорий [2, 3]. Клинические проявления, вызванные возбудителями нетифоидных сальмонеллез, существенно не отличаются друг от друга, в диагнозе нередко указывают лишь клиническую форму болезни и серотип выделенного штамма, что часто затрудняет определение верного источни-

Для корреспонденции:

Горох Алеветина Михайловна, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
E-mail: gorokh_am@antiplague.ru
ORCID: 0000-0002-2017-7992

Статья поступила 27.12.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Alevtina M. Gorokh, Junior Researcher of the department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 M.Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
E-mail: gorokh_am@antiplague.ru
ORCID: 0000-0002-2017-7992

The article was received 27.12.2024, accepted for publication 30.06.2025

ка заболевания [4]. Современная система классификации рода *Salmonella*, основанная на генетическом анализе, делит его на два вида: *S. enterica* и *S. bongori*. В группе *S. enterica* находятся все виды сальмонелл, вызывающие заболевания у людей и теплокровных животных. Этот вид дополнительно разделен на пять подвидов. Однако классификация *S. enterica* не ограничивается этим, так как каждый подвид имеет множество серотипов. Наиболее опасными для человека считаются сальмонеллы из подвида *S. enterica* subsp. *enterica* [5]. Мониторинговые исследования, прогнозирование развития эпидемиологической ситуации невозможны без эффективной системы дифференциации штаммов. Традиционное серотипирование (схема Уайта–Кауфмана–Ле) используется в качестве метода субтипирования сальмонелл более 80 лет и уже более 50 лет является сертифицированным подходом к мониторингу сальмонеллеза в общественном здравоохранении [6]. В последние годы широкое практическое применение для субвидовой характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа, обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с серологическими. Однако среди доступных в настоящее время методов генотипирования ни один не может быть назван универсальным. В этой связи для изучения молекулярно-генетических особенностей и филогенетических связей выделенных в 2022–2023 гг. на территории ДНР штаммов сальмонелл нами было проведено комплексное биоинформационное исследование полногеномных сиквентов этих изолятов с помощью авторских и сторонних программ.

Цель исследования – изучение генетических особенностей (INDEL-, SNP-, плазмидных профилей, наличия/отсутствия генов патогенности) штаммов *S. enterica*, выделенных в результате проведения исследований в Донецкой Народной Республике (ДНР) в 2022–2023 гг.

Материалы и методы

В работе были использованы 29 штаммов *S. enterica*, выделенных в 2022–2023 гг. на территории ДНР из клинического материала, продуктов питания и объектов окружающей среды. Для всех изолятов было проведено полногеномное секвенирование. Геномную ДНК выделяли набором «Рибо-Преп» («Амплисенс», Россия). Библиотеку фрагментов ДНК готовили с использованием набора реагентов Illumina Nextera Flex (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Ампликоны метили с использованием Nextera CD Index Kit (Illumina, США). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit. Сборку геномов осуществляли с помощью пакета SPAdes v.3.15.4 с параметрами по умолчанию [7].

Разделение по генам патогенности, серотипам и INDEL-маркерам проведено с помощью авторских программ FragmentExtractor v.4.0 и SalmonellaAnalyzer v.1.8.1, написанных на языке Java. Наличие и тип плазмид определены с использованием пакета PGCGAP v.1.0.35 с включенной базой данных plasmidfinder [8]. SNP-анализ проведен с помощью пакетов Snippy v.4.6.0 [9] и SNP-Dists v.0.8.2 [10]. Минимальное связующее дерево построено с использованием пакета языка Python networkx и визуализировано в программе Cytoscape v.3.10.1 [11].

Для верификации серотипов выделенных штаммов проводилось серологическое исследование по стандартной методике (ориентировочная реакция агглютинации на стекле) с соматическим (O) антигеном (A, B, C, D, E, Vi) и жгутиковыми (H) антигенами (a, b, c, d, e, h, i, k, r, y, z).

Результаты исследования и их обсуждение

В работе исследовали штаммы, выделенные от больных, из объектов окружающей среды и продуктов питания. По данным серологического исследования реакции агглютинации на стекле были установлены серотипы исследуемых штаммов, среди которых 22 принадлежали к серотипу Enteritidis, 3 – к Muenchen, 2 – к Saintpaul, 2 – к Agona. Результаты анализа полногеномного сиквенса изучаемых штаммов с помощью авторской программы SalmonellaAnalyzer v.1.8.1 по генетическим маркерам серотипов совпали с результатами серологического теста (табл. 1).

INDEL-типирование является одним из информативных методов генетической дифференциации ряда возбудителей инфекционных заболеваний, в т.ч. возбудителей сальмонел-

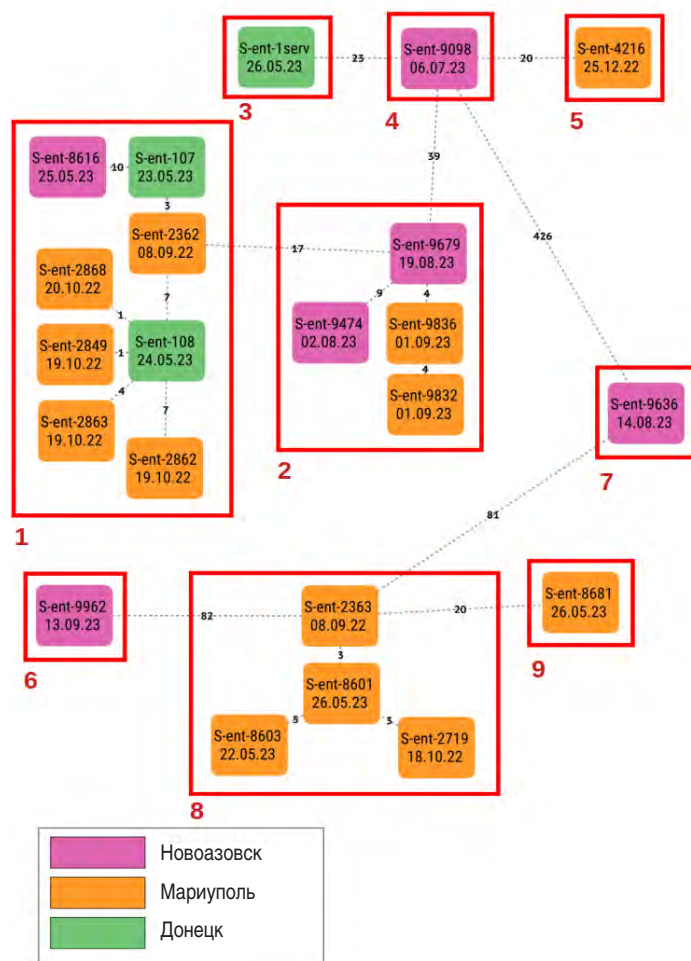


Рис. 1. Филогенетическая характеристика исследуемых штаммов с помощью SNP-анализа, минимальное связующее дерево (маленькими цифрами на ребрах показано различие в количестве однонуклеотидных замен (SNP) между штаммами, большими – наименование кластеров).

Fig. 1. Phylogenetic characteristics of the studied strains (small numbers indicate the quantitative difference in SNP, big numbers are for clusters naming).

Таблица 1. Характеристика выделенных штаммов по серотипам
Table 1. Characteristics serotyping of isolated strains

Количество штаммов / Number of strains	Дата выделения / Date of isolation	Место выделения / Place of isolation	Источник выделения / Source of isolation	Антигенная формула / Antigenic formula	Серотип / Serotype
2	Сентябрь 2022 г. / September 2022	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
4	Октябрь 2022 г. / October 2022	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Октябрь 2022 г. / October 2022	г. Мариуполь / Mariupol	Продукты питания / Food products	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Декабрь 2022 г. / December 2022	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
3	Май 2023 г. / May 2023	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
2	Май 2023 г. / May 2023	г. Донецк / Donetsk	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Май 2023 г. / May 2023	г. Мариуполь, Азовское море, створ 110 / Mariupol, Sea of Azov, range 110	Вода / Water	4:f,g,s:-	Agona
1	Май 2023 г. / May 2023	г. Новоазовск / Novoazovsk	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Май 2023 г. / May 2023	г. Донецк / Donetsk	Продукты питания / Food products	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Май 2023 г. / May 2023	г. Мариуполь, р.Кальмиус, створ 70 / Mariupol, Kalmius river, alignment 70	Вода / Water	4:f,g,s:-	Agona
1	Июль 2023 г. / July 2023	г. Новоазовск / Novoazovsk	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
2	Июль 2023 г. / July 2023	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	8:d:1.2	Muenchen
2	Август 2023 г. / August 2023	г. Новоазовск / Novoazovsk	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Август 2023 г. / August 2023	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	8:d:1.2	Muenchen
2	Август 2023 г. / August 2023	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	4:e,h:1.2	Saintpaul
1	Август 2023 г. / August 2023	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
2	Сентябрь 2023 г. / September 2023	г. Мариуполь / Mariupol	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
1	Сентябрь 2023 г. / September 2023	г. Новоазовск / Novoazovsk	Клинический материал / Clinical specimens	1,9,12:g,m:-	Enteritidis

леза, и позволяет разделять штаммы *Salmonella* spp. внутри серотипа [12]. Проведенный нами анализ по трем локусам – STY0865, STY1371 и STY1478 – позволил разделить изучаемые штаммы на три группы: в группу 1 и 2 попали изоляты *S. enterica* Enteritidis, а в третью – остальные серогруппы (табл. 2).

По плазмидному профилю штаммы *S. enterica* были разделены на 9 групп (А-Н) по семи плазмидам, обнаруженных у микроорганизмов (табл. 3).

Важно отметить, что изучение плазмидного профиля ограничивает проведение ретроспективного анализа из-за потери плазмид в процессе многочисленных пассажей. Данный факт может привести к проблемам с интерпретацией результатов при использовании штаммов в экспериментах, разделенных временными рамками.

Был проведен филогенетический SNP-анализ выделенных штаммов. Для этого использовался пакет Snippy, суть которого состоит в поиске «коровых» SNP (core SNP) в исследуемых геномах при сравнении его с референсным

(использовалась референс последовательность штамма *S. enterica* Typhimurium LT2). В хромосомных и плазмидных регионах генома *de novo* для исследуемой выборки последовательностей найдено 36 671 SNP.

По выравненным последовательностям «коровых» SNP с помощью пакета SNP-Dists строилась матрица парных отличий, инструментом networkx было получено минимальное связующее дерево, которое визуализировалось в программе Cytoscape.

Так, было показано, что штаммы серотипа *S. enterica* Enteritidis разделились на 9 кластеров (рис. 1). Как видно, различия между группами составляют от 17 до 426 п.о., тем временем внутри группы штаммы различаются на единицы-десятки SNP. Кластеры могут отражать отдельные очаги инфекции, имея в своем составе клональные комплексы с отличием в 1–4 SNP или близкородственные изоляты с отличием до 10 SNP. Таким образом, можно провести минимальную эпидемиологическую оценку возникновения и распространения штаммов одного серотипа.

Таблица 2. Различия в INDEL-профилях исследуемых изолятов
Table 2. Differences in INDEL-profiles of the studied isolates

Количество штаммов / Number of strains	Серотип / Serotype	Размер ампликона в INDEL-локусе (п.о.) / Amplicon size in INDEL locus (bp)			INDEL-тип / INDEL-type
		STY0865	STY1371	STY1478	
13	Enteritidis	63	81	77	1
2	Enteritidis	63	81	77	1
7	Enteritidis	69	75	62	2
2	Agona	69	81	77	3
3	Muenchen	69	81	77	3
2	Saintpaul	69	81	77	3

Показано, что штаммы *S. enterica* Enteritidis, разделенные на два INDEL-типа, имеют дифференцированный профиль по однонуклеотидным полиморфизмам, отражающийся в разделении на различные кластеры по SNP (рис. 2).

Был проведен анализ встречаемости основных 13 генов патогенности. Для дальнейшей детерминации нами было выбрано 6 генов патогенности: *spvR*, *sel1*, *rhs*, *sseC*, *spi4R*, *pipB* (табл. 4). Установлено, что только штаммы серотипа *S. Enteritidis* содержали регуляторный ген *spvR*, отвечающий

Таблица 3. Плазмидные профили анализируемых штаммов
Table 3. Plasmid profiles of the studied strains

Количество штаммов / Number of strains	Серотип / Serotype	Плазмиды / Plasmids	Плазмидный тип / Plasmid type
14	Enteritidis	IncFIB(S)_1, IncFII(S)_1	A
2	Enteritidis	IncFIB(S)_1, IncFII(S)_1	A
3	Enteritidis	IncFIB(S)_1	B
2	Agona	не найдено	C
1	Enteritidis	IncFII(S)_1	D
1	Muenchen	Col440I_1, ColRNAI_1	E
1	Muenchen	Col440I_1, Inc1_1_Alpha	F
1	Muenchen	Col156_1, Col440I_1, ColRNAI_1, Inc1_1_Alpha	G
1	Enteritidis	Col440I_1, Inc1_1_Alpha	F
1	Saintpaul	ColRNAI_1	H
1	Saintpaul	не найдено	C
1	Enteritidis	ColpVC_1, IncFIB(S)_1, IncFII(S)_1	I

за работу *Spv*-оперона генов патогенности, определяющего устойчивость сальмонелл к фагоцитозу посредством рибозилирования компонента цитоскелета актина, останавливая таким образом объединение фагосомы с лизосомой у макрофагов. В геноме водных штаммов серотипа *Agona* отсутствовали два острова патогенности: SPI-2 (кодирует вторую систему секреции III типа) и SPI-4 (кодирует систему секреции I типа, участвующую в секреции токсина). Ген *sel1*, регулирующий экспрессию генов *T3SS*, и ген *rhs*, регулирующий внутримакрофагальную репликацию, были найдены у всех штаммов серотипов *S. Enteritidis* и *S. Agona*.

Так, с сентября по декабрь 2022 г. в Мариуполе были выделены из клинического материала по совокупности генетических признаков два основных геноварианта *S. enterica* Enteritidis. Также на данной территории в период с июля по август 2023 г. из клинического материала были изолированы штаммы серотипов *Muenchen* и *Saintpaul*, имеющие идентичную генетическую организацию по INDEL-типу с гетерогенностью по плазмидному профилю. Штаммы, выделенные из Азовского моря и реки Кальмиус, принадлежали к серотипу *Agona* и имели один INDEL- и плазмидный типы, с содержанием в своем геноме одинаковых генов патогенности, что указывает на персистенцию в данных водоемах единого клонального комплекса данных микроорганизмов. Комплексный молекулярно-генетический анализ позволил определить, что в г. Донецке (ДНР) в мае 2023 г. циркулировали штаммы одного генотипа. В г. Мариуполе за 2023 г. по совокупности признаков циркулировали 4 различных геноварианта *S. enterica* Enteritidis, послужившие причиной возникновения вспышек острого гастроэнтерита, т.к. исследуемые штаммы имели различный INDEL-тип, что дает основание предполагать наличие различных источников распространения острых кишечных инфекций. Таким образом, в период с 2022 по 2023 г. в Мариуполе увеличилось многообразие циркулирующих штаммов. В Новоазовске в период с мая и до середины августа 2023 г. циркулировал один геновариант серотипа Enteritidis, с последующей сменой на штамм с иным INDEL-типом и плазмидным профилем

Sankey Diagram: INDEL Cluster

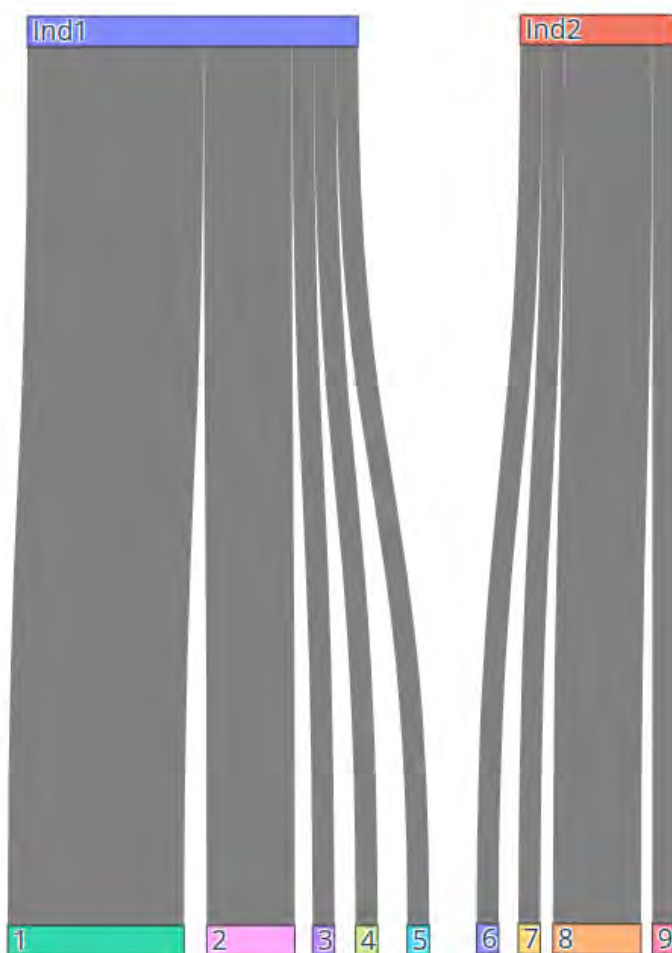


Рис. 2. Sankey-диаграмма, отображающая корреляцию между INDEL-типами и SNP-кластерами (толщина линий – количество штаммов, принадлежащих связке типов).

Fig. 2. Sankey diagram for INDEL-types versus SNP-clusters illustration (width of lines – number of strains for types connection)

Таблица 4. Различия в наличии/отсутствии генов патогенности у обозначенных штаммов
Table 4. Differences in the presence/absence of pathogenicity genes in the designated strains

Количество штаммов / Number of strains	Серотип / Serotype	Гены патогенности / Pathogenicity-related genes						Генотип / Genotype
		<i>spvR</i>	<i>Sel1</i>	<i>Rhs</i>	<i>sseC</i> (SPI-2)	<i>spi4R</i> (SPI-4)	<i>pipB</i> (SPI-5)	
19	Enteritidis	1	1	1	1	1	1	1
2	Enteritidis	1	1	1	1	1	1	1
1	Enteritidis	0	1	1	1	1	1	2
2	Agona	0	1	1	0	0	1	3
3	Muenchen	0	0	0	1	1	1	4
2	Saintpaul	0	0	0	1	1	1	4

Таблица 5. Генетическая характеристика штаммов
Table 5. Genetic characteristics of strains

Серотип / Serotype	Плазмидный тип / Plasmid type	INDEL-тип / INDEL-type	Тип по генам патогенности / Type by pathogenicity genes	Дата выделения / Date of allocation	Место выделения / Place of allocation
Enteritidis	A	1	1	08.09.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	2	1	08.09.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	2	1	18.10.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	19.10.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	19.10.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	20.10.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	25.12.2022	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	B	2	2	26.05.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	B	2	1	22.05.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	D	2	1	26.05.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	01.09.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	01.09.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Enteritidis	A	1	1	23.05.2023	г. Донецк / Donetsk
Enteritidis	A	1	1	24.05.2023	г. Донецк / Donetsk
Enteritidis	A	1	1	26.05.2023	г. Донецк / Donetsk
Enteritidis	B	1	1	25.05.2023	г. Новоазовск / Novozovsk
Enteritidis	A	1	1	06.07.2023	г. Новоазовск / Novozovsk
Enteritidis	F	1	1	02.08.2023	г. Новоазовск / Novozovsk
Enteritidis	A	2	1	14.08.2023	г. Новоазовск / Novozovsk
Enteritidis	A	1	1	19.08.2023	г. Новоазовск / Novozovsk
Enteritidis	I	2	1	13.09.2023	г. Новоазовск / Novozovsk
Muenchen	E	3	4	11.07.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Muenchen	F	3	4	19.07.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Muenchen	G	3	4	05.08.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Saintpaul	H	3	4	12.08.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Saintpaul	C	3	4	19.08.2023	г. Мариуполь / Mariupol
Agona	C	3	3	24.05.2023	г. Мариуполь, Азовское море, створ 110 / Mariupol, Sea of Azov, range 110
Agona	C	3	3	26.05.2023	г. Мариуполь, р.Кальмиус, створ 70 / Mariupol, Kalmius river, alignment 70

(табл. 5). Обращает на себя внимание несоответствие SNP-кластеров и INDEL-типов. Так, например, штаммы *S. Enteritidis*, выделенные в Донецке в 2023 г., по SNP-анализу образовали два различных кластера, однако вошли

в один INDEL-тип, также изоляты из Новоазовска были разделены на первый, второй и четвертый кластеры по консервативной части генома и вошли в один INDEL-генотип и имели гетерогенный плазмидный профиль.

Заключение

В результате проведенной работы была дана генетическая характеристика 29 штаммов, выделенных от больных, из пищевых продуктов и водных источников в Донецкой Народной Республике в 2022–2023 гг. С помощью ориентировочной реакции агглютинации и биоинформационного анализа по маркерным генам было установлено, что к серотипу *S. enterica* Enteritidis относились 22 изолята, три – к *S. enterica* Muenchen, по два – к *S. enterica* Saintpaul и *S. enterica* Agona. Была дана филогенетическая характеристика исследуемых штаммов, на основании которой исследуемые штаммы были разделены на 9 кластеров. Проведенный INDEL-анализ по трем локусам позволил разделить штаммы *S. enterica* Enteritidis на две группы.

Полученные данные позволяют провести дифференциальный анализ исследуемых штаммов, а также оценить их генетическое разнообразие. Данная работа позволила оценить циркуляцию штаммов различных серотипов *S. enterica*, что впоследствии может быть использовано для мониторинговых исследований за сальмонеллезом на территории ДНР и других регионов Российской Федерации.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках выполнения стратегической инициативы социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 года «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Financial support

The work was carried out within the framework of the strategic initiative for the socio-economic development of the Russian Federation until 2030 “The country's sanitary shield – health safety (prevention, detection, response)”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Ehrhardt K, Becker AL, Grassl GA. Determinants of persistent *Salmonella* infections. *Curr Opin Immunol.* 2023 Jun;82:102306. DOI: 10.1016/j.coi.2023.102306
2. Николаева ИВ, Ткачева СВ, Фазульязнова АИ, Латфуллина ЗЗ, Рахманова ОА, Белова МН. Клинико-эпидемиологическая и лабораторная характеристика пищевой вспышки сальмонеллеза. *Практическая медицина.* 2023;21(2):42–47. DOI: 10.32000/2072-1757-2023-2-42-47
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076 (дата обращения: 30.10.2024).
4. Малугин СВ, Винокурова АА. Клинические рекомендации в системе регламентации оказания медицинской помощи в современной России: теоретическое представление и практические аспекты. *Lex Russica.* 2023;76,7(200):28–47. DOI: 10.17803/1729-5920.2023.200.7.028-047
5. Байсарова ЗТ. Сальмонеллы: классификация, антигенная структура и факторы патогенности. *Вестник Медицинского института.* 2021;1:88–92.

6. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PA, et al. Supplement 2003–2007 (No 47) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2010 Jan-Feb;161(1):26–9. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.10.002
7. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020 Jun;70(1):e102. DOI: 10.1002/cpbi.102
8. Liu H, Xin B, Zheng J, Zhong H, Yu Y, Peng D, et al. Build a bioinformatic analysis platform and apply it to routine analysis of microbial genomics and comparative genomics. 2022. DOI: 10.21203/rs.2.21224/v6
9. GitHub – tseemann/snippy: scissors: Rapid haploid variant calling and core genome alignment [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения: 30.10.2024).
10. GitHub – tseemann/snp-dists: Pairwise SNP distance matrix from a FASTA sequence alignment [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://github.com/tseemann/snp-dists> (дата обращения: 30.10.2024).
11. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov;13(11):2498–504. DOI: 10.1101/gr.1239303
12. Водопьянов АС, Водопьянов СО, Трухачев АЛ, Олейников ИП, Демидова ГВ, Мишанькин БН. Разработка метода дифференцировки *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* на основе INDEL-маркеров. *Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных заболеваний.* 2014;147–150.

References

1. Ehrhardt K, Becker AL, Grassl GA. Determinants of persistent *Salmonella* infections. *Curr Opin Immunol.* 2023 Jun;82:102306. DOI: 10.1016/j.coi.2023.102306
2. Nikolaeva IV, Tkacheva SV, Fazulzyanova AI, Latfullina EZ, Rakhmanova OA, Belova MN. Clinical-epidemiological and laboratory characteristics of a food salmonellosis outbreak. *Practical Medicine.* 2023;21(2):42–47. DOI: 10.32000/2072-1757-2023-2-42-47 (In Russian).
3. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2022. The State report. [Electronic resource]. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076 (accessed: 30.10.2024) (In Russian).
4. Malyugin SV, Vinokurova AA. Clinical Guidelines in the System of Medical Care in Modern Russia: Theoretical Statement and Practical Aspects. *Lex Russica.* 2023;76, 7(200):28–47. DOI: 10.17803/1729-5920.2023.200.7.028-047 (In Russian).
5. Baysarova ZT. *Salmonella*: classification, antigenic structure and pathogenicity factors. *Bulletin of the Medical Institute.* 2021;1:88–92. (In Russian).
6. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PA, et al. Supplement 2003–2007 (No 47) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2010 Jan-Feb;161(1):26–9. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.10.002
7. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020 Jun;70(1):e102. DOI: 10.1002/cpbi.102
8. Liu H, Xin B, Zheng J, Zhong H, Yu Y, Peng D, et al. Build a bioinformatic analysis platform and apply it to routine analysis of microbial genomics and comparative genomics. 2022. DOI: 10.21203/rs.2.21224/v6
9. GitHub – tseemann/snippy: scissors: Rapid haploid variant calling and core genome alignment [Electronic resource]. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed: 30.10.2024). (In Russian).
10. GitHub – tseemann/snp-dists: Pairwise SNP distance matrix from a FASTA sequence alignment [Electronic resource]. Available at: <https://github.com/tseemann/snp-dists> (accessed: 30.10.2024). (In Russian).

11. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov;13(11):2498-504. DOI: 10.1101/gr.1239303
12. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Trukhachev AL, Oleynikov IP, Demidova GV, Mishan'kin BN. Development of a method for differentiating *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* based on INDEL markers. *Modern Aspects of the Study of Especially Dangerous and Other Infectious Diseases.* 2014;147-150. (In Russian).

Информация о соавторах:

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Герасименко Артём Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7700-3483

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Information about co-authors:

Aleksey S. Vodopyanov, PhD, MD, Leading Researcher of the laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Artem A. Gerasimenko, Junior Researcher of the laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7700-3483

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7178-8021

НОВОСТИ НАУКИ

Консорциумы бактерий и бактериофагов

Микробиом является предиктором клинического исхода у пациентов, получающих аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Метаболиты, полученные из микробиоты, могут модулировать эти исходы. То, как бактерии, грибки и вирусы способствуют производству кишечных метаболитов, до сих пор неясно. Мы объединили секвенирование ампликонов, вирусную метагеномику и целевую метаболомику из образцов стула пациентов, получающих алло-ТГСК ($n = 78$), и обнаружили сигнатуру микробиома *Lachnospiraceae* и *Oscillospiraceae* и связанных с ними бактериофагов, коррелирующую с производством иммуномодулирующих метаболитов (ИММ). Более того, мы установили индекс риска ИМП (ИММ-РИ), который был связан с улучшением выживаемости и снижением рецидивов. У пациентов с низким риском ИММ-РИ было обнаружено большое количество путей биосинтеза короткоцепочечных жирных кислот, в частности масляной кислоты через бутирил-кофермент А (CoA): ацетат-КоА-трансферазу (BCoAT, которая катализирует EC 2.8.3.8), а сборка генома вирома выявила два бактериофага, кодирующих BCoAT как вспомогательный метаболический ген. В заключение следует отметить, что наше исследование выявляет сигнатуру микробиома, связанную с защитными ИММ, и дает обоснование для рассмотрения консорциумов, продуцирующих метаболиты, и формул метаболитов в качестве терапии на основе микробиома.

Thiele Orberg E, Meedt E, Hiergeist A, Xue J, Heinrich P, Ru J, et al.
Bacteria and bacteriophage consortia are associated with protective intestinal metabolites in patients receiving stem cell transplantation.
Nat Cancer. 2024 Jan;5(1):187-208. DOI: 10.1038/s43018-023-00669-x

Сравнительный анализ методов генотипирования штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

С началом пандемии COVID-19 возникла острая необходимость в генотипировании патогенов, которые могут сопутствовать вирусным инфекциям, таким как вирусная пневмония. Среди грамотрицательной микрофлоры доминирующим ассоциантом вирусной пневмонии явилась в т.ч. *Pseudomonas aeruginosa*. Изучение путей распространения данного патогена является важной задачей и невозможно без глубокого изучения структурной организации генома, мониторинга факторов персистенции среди новых клинических изолятов. Вопрос о выборе метода генотипирования остается открытым. Современные методы INDEL-, WG-SNP- и вирулотипирования широко распространены, но до сих пор не определено, какой из них следует применять для анализа и какой из них более валиден. С учетом этого цель работы состояла в сравнении результатов анализа INDEL-, вируло- и WG-SNP-типирования штаммов *P. aeruginosa* различного происхождения. В ходе исследования была продемонстрирована независимость методов вируло-, INDEL- и WG-SNP-типирования: каждую из рассмотренных методик следует использовать как самостоятельный метод для анализа WGS-данных – либо проводить вирулотипирование для выявления наиболее патогенных штаммов, либо, используя INDEL-типирование, выявлять близкородственные группы штаммов с последующим WG-SNP-типированием этих групп.

Ключевые слова: SNP-типирование, Indel-типирование, *Pseudomonas aeruginosa*, вирулом, танглеграмма

Для цитирования: Ковалевич А.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. Сравнительный анализ методов генотипирования штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2025; 10(2): 67–73. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-67-73

Comparative analysis of methods of genotyping *Pseudomonas aeruginosa* strains

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

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

With the outbreak of the COVID-19 pandemic, there is an urgent need to genotype pathogens that can accompany viral infections, such as viral pneumonia. Among gram-negative microflora, *Pseudomonas aeruginosa* was identified as the dominant associate of viral pneumonia. Studying the pathways of this pathogen is crucial, and this endeavor is impossible without in-depth study of the structural organization of its genome and monitoring of persistence factors among new clinical isolates. The question of choosing a genotyping method remains open. Modern INDEL, WG-SNP, and virulotyping techniques are widely used, but it has not yet been determined which technique is most suitable for analysis and which offers the greatest validity. Based on this, the aim of this work was to compare the results of INDEL, viral, and WG-SNP typing of *P. aeruginosa* strains from various origins. The study demonstrated the independence of viral, INDEL, and WG-SNP typing methods. Each method should be used as an independent tool for analyzing whole-genome sequencing (WGS) data: virulotyping to identify the most pathogenic strains, or INDEL typing to identify closely related groups of strains followed by WG-SNP typing of these groups.

Key words: SNP typing, Indel typing, *Pseudomonas aeruginosa*, viruloma, tangleggram

For citation: Kovalevich A.A., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S. Comparative analysis of methods of genotyping *Pseudomonas aeruginosa* strains. Bacteriology. 2025; 10(2): 67–73. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-67-73

Для корреспонденции:

Ковалевич Алексей Александрович, младший научный сотрудник
лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных
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 14.02.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Alexey A. Kovalevich, Junior Researcher, Laboratory of molecular biology
of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific
Research Institute of Rospotrebnadzor

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 14.06.2025, accepted for publication 30.06.2025

Современные исследования инфекционных заболеваний нельзя представить без применения молекулярно-генетических средств и методик анализа штаммов. Технологии полногеномного секвенирования (whole genome sequencing/WGS), а также автоматизация процессов расчета и обработки данных помогают сократить многократно время ответа и повысить его качество.

Одним из инфекционных агентов, на который мир обратил серьезное внимание, стала *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка). В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения заявила, что карбапенеморезистентные штаммы *P. aeruginosa* занимают второе место в приоритетном листе патогенов, требующих разработки новых антимикробных препаратов [1]. Позже, с 2020 г., пандемия COVID-19 послужила фактором для селективного отбора представителей группы ESKAPE в сторону пан-антибиотикорезистентности и комплексной передачи генетических факторов патогенности внутри представителей группы. Создание крупных инфекционных стационаров с высокой концентрацией пациентов с COVID-19 привело к ухудшению течения болезни у пациентов, увеличению риска негативных исходов и, как следствие, к более длительному пребыванию в медицинском учреждении. У больных COVID-19 среди грамотрицательной микрофлоры доминирующими ассоциантами пневмонии явились *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, несколько реже определялись *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, грибы рода *Candida*, при этом их патогенный потенциал резко возрос за счет горизонтального переноса генетического материала (например, плазмид, IS-элементов и др.), тем самым увеличив число случаев с летальным исходом [2–4].

Поиск новых способов противодействия данному микроорганизму является важной задачей и невозможен без глубокого изучения структурной организации генома, мониторинга факторов персистенции и патогенности микробов вновь изолируемых клинических изолятов. Как известно, бактерии синегнойной палочки подвержены достаточно быстрой изменчивости, формирующейся благодаря широкой горизонтальной передаче генетического материала.

Генотипирование *P. aeruginosa* осуществляется с использованием методики, основанной на анализе распределения однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism/SNP). Этот метод широко применяется в научных исследованиях и эпидемиологическом анализе, поскольку позволяет оценить филогенетические связи между разными штаммами, установить их возможное происхождение, а также источники и пути распространения инфекции [5]. В ряде случаев набор SNP-маркеров подбирается непосредственно для анализируемого набора штаммов, с использованием либо диагностически значимых SNP (canSNP), либо референсного (эталонного) генома для построения филогенетических деревьев. Необходимость в референсном геноме является ограничением, поскольку он должен быть тесно связан с геномом изучаемых изолятов, чтобы выявить истинные филогенетически информативные SNP [6]. Альтернативой может стать WG-SNP-анализ (полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов).

Новая методика INDEL-типирования, разработанная для *P. aeruginosa*, основана на выявлении коротких вставок/

делеций (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов в целевых генах. Использование для анализа 10 INDEL-локусов позволяет провести внутривидовую дифференциацию штаммов как *in vitro* (в полимеразной цепной реакции), так и *in silico* (на основе данных полногеномного секвенирования). Кроме этого, можно установить, что штаммы не являются одним клональным комплексом внутри одного серо- или MLST-типа. Разработанная схема INDEL-типирования может использоваться как самостоятельно, так и дополнять другие методы, тем самым повышая дискриминирующую силу проводимого анализа [7].

Примечательно, что уже имеется исследование, в котором проводилось сравнение полногеномного (wgMLST) и базового (cgMLST) MLST-анализа с использованием SNP. В этом исследовании применялись методы линейной регрессии и расчета коэффициента корреляции. В результате были получены высокие значения коэффициента корреляции между SNP- и cgMLST-типированием [8].

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном анализе результатов INDEL-, вируло- и WG-SNP-типирования штаммов *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

В работе использовали WGS-данные о 18 штаммах *P. aeruginosa*, полученных из лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Штаммы выделены в Хабаровске и Мариуполе в период с 2022 по 2023 г. Полногеномное секвенирование проведено в ходе реализации федерального проекта социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)». Также использовали 58 полных геномов штаммов, изолированных на территории Российской Федерации (Москва, Самара) в период с 2006 по 2020 г., полученных из международной базы NCBI.

Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторской программы по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [9]. Отображение дендрограммы выполняли с помощью программы FigTree v 1.4.3 [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]. WG-SNP-анализ полногеномных данных осуществляли с использованием авторской программы. INDEL-типирование и идентификацию генов патогенности выполняли с использованием программы *Pseudomonas Analyser* (<http://antiplague.ru/pseudomonas-analyser>) [7, 10]. Статистическая обработка результатов и построение танглеграмм (Tanglegram plot) осуществлялись с использованием пакета Base R v4.1.2 [11]. Для танглеграмм статистически измерялась связь между ветвями в двух противоположных дендрограммах с помощью расчета γ -индекса Бейкера (BGI) [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Точность определения генетического родства штаммов имеет важное значение для выявления и расследования вспышек. В связи с этим основная цель этого исследования



Рис. 1. Танглеграмма, отражающая согласованность между WG-SNP- и INDEL-типированием. Дендрограмма, построенная на основе WG-SNP-анализа, – слева, дендрограмма, построенная по INDEL-локусам, – справа.

Fig. 1. Tanglegram reflecting the agreement between WG-SNP typing and INDEL typing. Dendrogram constructed based on WG-SNP analysis on the left, dendrogram constructed based on INDEL loci on the right.

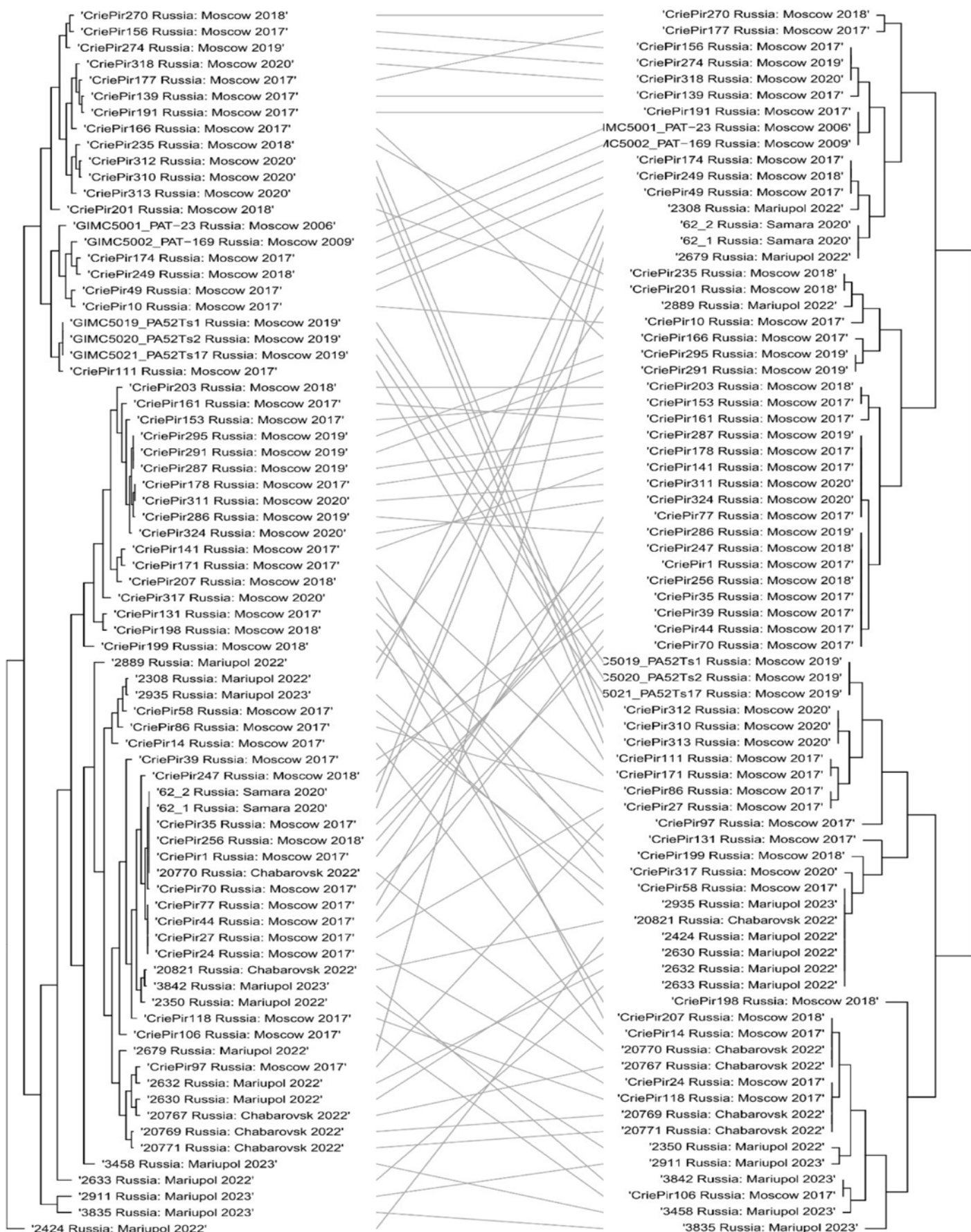


Рис. 2. Танглеграмма, отражающая согласованность между вирулотипами и INDEL-типированием. Дендрограмма, построенная на основе вирулотипов, – слева, дендрограмма, построенная по INDEL-локусам, – справа.
 Fig. 2. Tanglegram showing the agreement between virulotypes and INDEL typing. Dendrogram based on virulotypes on the left, dendrogram based on INDEL loci on the right.

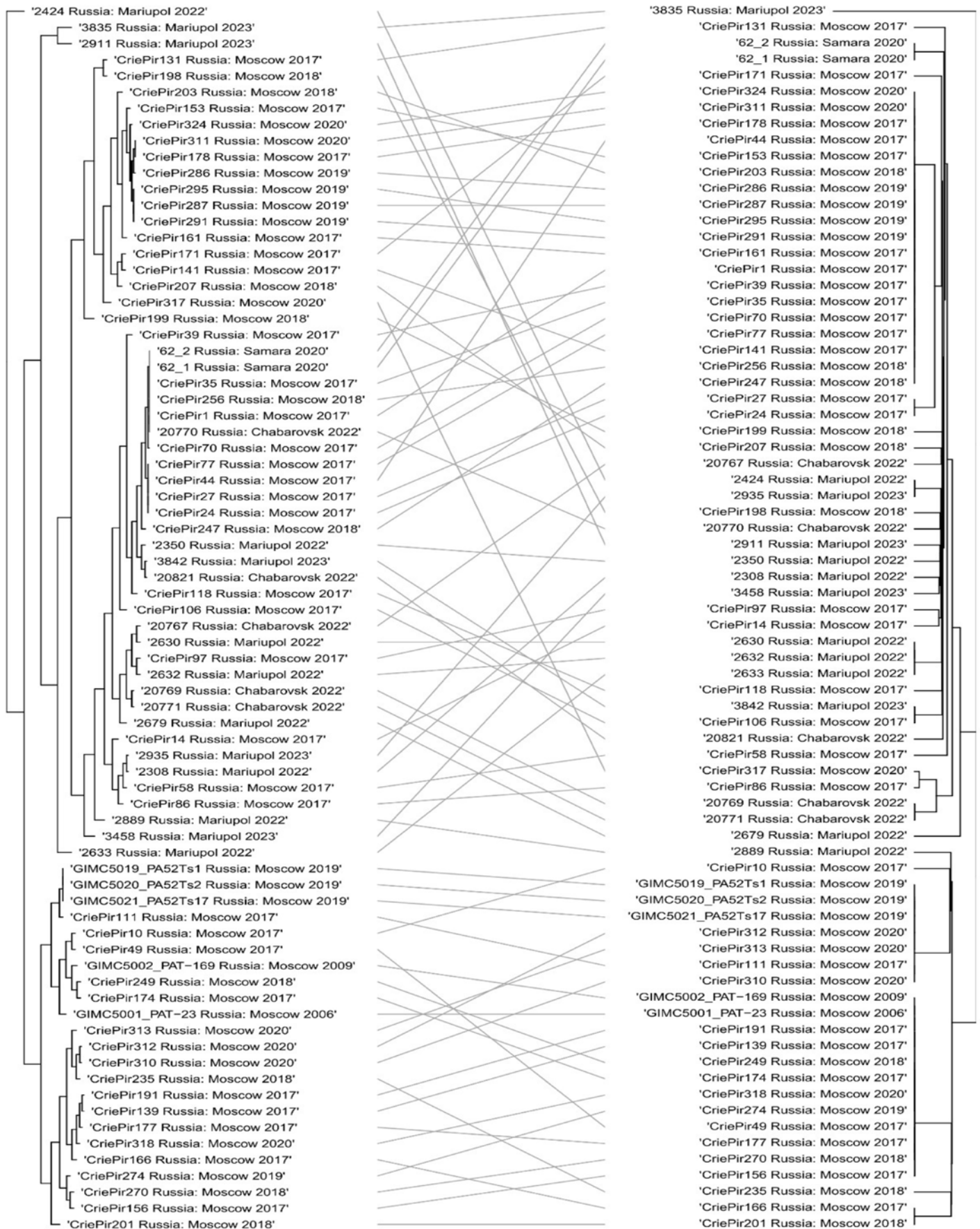


Рис. 3. Танглеграмма, отражающая согласованность между вирулотипами и WG-SNP-типированием. Дендрограмма, построенная на основе вирулотипов, – слева, дендрограмма, построенная на основе WG-SNP-типирования, – справа.

Fig. 3. Tanglegram showing the agreement between virulotypes and WG-SNP typing. The dendrogram based on virulotypes is on the left, the dendrogram based on WG-SNP typing is on the right.

состояла в том, чтобы проверить, являются ли методики внутривидового типирования равноценными или же их следует использовать по отдельности в зависимости от задач исследования или арсенала средств и технической базы.

При анализе вспышки заболевания, вызванной бактерией *P. aeruginosa*, проведенном с применением методов VNTR-типирования и полногеномного секвенирования, авторы пришли к выводу о целесообразности применения на первом этапе простого и быстрого метода MLVA с последующим секвенированием изолятов с одинаковым MLVA-профилем [13].

С целью выявления корреляции между различными методиками внутривидового генотипирования было проведено построение дендрограмм. Дендрограмма WG-SNP-анализа была построена с использованием 68 366 полиморфизмов в отобранных геномах *P. aeruginosa*. Дендрограмма, использующая методику INDEL-типирования, была построена по 10 INDEL-локусам. Далее на основе построенных дендрограмм при помощи Base R была собрана танглеграмма (рис. 1).

Таким образом, используя сравнение с применением BGI, было установлено, что кластеризация, используемая в рассматриваемых методиках статистически, не коррелирует. Показатель BGI был в диапазоне от 0,066 до 0,23, что свидетельствует о вышесказанном расхождении в корреляции.

Исходя из этого, был сделан вывод о причинах данного результата. Учитывая, что однонуклеотидные полиморфизмы накапливаются постоянно, применив к этому аспекту концепцию молекулярных часов и выбранный WG-SNP-анализ, можно сказать о том, что данная методика отражает микроразличия изменения геномов *P. aeruginosa*. В то же время INDEL-локусы являются более «стабильными» участками ДНК, но при этом имеют свои отличия, достаточные, чтобы обнаружить внутривидовую дифференциацию штаммов, не разделяя их на множество кластеров, что позволяет выделять в выборке штаммов генетически близкие варианты микроорганизмов либо их клональные комплексы. Возможно, следует комбинировать данные методики независимо друг от друга. Сначала необходимо выделить какие-то близкородственные штаммы, сгруппировать их по INDEL-типам, а затем изучить SNP-профиль. С другой стороны, это поможет выбирать ту или иную методику, исходя из задач исследования.

В дальнейшем было решено сравнить вирулотипы выбранных штаммов с использованием методов WG-SNP- и INDEL-типирования. В определении вирулотипов использовали программу *Pseudomonas Analyser* с уже заложенной в нее базой 25 генов патогенности. По результатам анализа создана дендрограмма, которая была, как и ранее, сопоставлена с дендрограммой по INDEL-локусам и WG-SNP. В результате были построены танглеграммы (рис. 2, 3).

Низкая согласованность была показана для вирулотипов в сопоставлении с INDEL-типированием, показатель BGI варьировал от 0,072 до 0,19. Вопрос о том, почему эти два метода могли статистически не согласоваться, не возникает. Изначально было интересно эмпирически продемонстрировать это, чтобы в дальнейшем не велись дискуссии о выборе метода. В ходе расследования вспышки могут быть отобраны пара или группа штаммов со схожим набором генов,

ответственных за реализацию их патогенного потенциала, не имеющих клональной природы. Ответить на этот вопрос поможет INDEL-типирование. Использование методики типирования только по вирулотипам может привести к ошибочным выводам при изучении происхождения и генетического родства штаммов.

Интересно отметить, что, напротив, согласованность между вирулотипами и WG-SNP-типированием была умеренная, значения BGI варьировали от 0,72 до 0,76, что указывает на статистически схожую кластеризацию. Это объясняется тем, что применяемый в построении дендрограмм алгоритм UPGMA при подсчете задействует попарную матрицу сходства/несходства, что обуславливает одинаковые сценарии кластеризации. Это, в свою очередь, приводит к умеренным значениям BGI.

Однако нельзя однозначно и уверенно сказать о смежности и универсальности этих методик. В связи с этим требуется дальнейшее изучение этого вопроса с использованием других методов сравнения филогенетических кластеров.

Заключение

Применяемый подход статистического сравнения методов типирования *P. aeruginosa* продемонстрировал свою эффективность в оценке различных методик, основанных на построении филогенетических деревьев.

Показана независимость методов вируло-, INDEL- и WG-SNP-типирования. Каждую из рассмотренных методик следует использовать как самостоятельный метод для анализа WGS-данных: либо проводить вирулотипирование для выявления наиболее патогенных штаммов, либо, используя INDEL-типирование, выявлять близкородственные группы штаммов с последующим WG-SNP-типированием этих групп.

Информация о финансировании

Исследование проведено в рамках НИР №227-3-23 «Сравнительный анализ возбудителей внебольничных и внутрибольничных пневмоний у пациентов в медицинских учреждениях Южного федерального округа РФ (Ростовская область) в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции и в постковидный период».

Financial support

The study was conducted within the framework of research No 227-3-23 "Comparative analysis of pathogens of community-acquired and nosocomial pneumonia in patients in medical institutions of the Southern Federal District of the Russian Federation (Rostov region) in the context of a pandemic of a new coronavirus infection and the post covid period".

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization. 2017;27:318-27.

2. Максимова ЕА, Козлов АВ, Лямин АВ, Жестков АВ, Гусякова ОА, Золотов МО. Микрофлора мокроты и аутопсийного материала пациентов с COVID-19. Клиническая лабораторная диагностика. 2022;67(6):380-384. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-380-384
3. Носков АК, Попова АЮ, Водопьянов АС, Писанов РВ, Чемисова ОС, Павлович НВ, и др. Молекулярно-генетический анализ возбудителей бактериальных пневмоний, ассоциированных с COVID-19, в стационарах г. Ростова-на-Дону. Здоровье населения и среда обитания. 2021;12:64-71. DOI: 10.35627/2219-5238/2021-29-12-64-71
4. Павлович НВ, Цимбалюкова МВ, Аронова НВ, Анисимова АС, Водопьянов СО, Водопьянов АС, и др. Внебольничные пневмонии бактериальной этиологии и спектр чувствительности возбудителей к антибиотикам у коронапозитивных и коронанегативных больных г. Ростова-на-Дону. Антибиотики и химиотерапия. 2021;66(1-2):26-32. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-1-2-26-32
5. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Clin Microbiol Infect. 2018 Apr;24(4):335-341. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.013
6. Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, et al. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. J Hosp Infect. 2018 Mar;98(3):282-288. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.12.005
7. Ковалевич АА, Водопьянов АС, Водопьянов СО, Телякова СЮ. INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2024;9(4):75-81. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81
8. Blanc DS, Magalhães B, Koenig I, Senn L, Grandbastien B. Comparison of Whole Genome (wg-) and Core Genome (cg-) MLST (BioNumericsTM) Versus SNP Variant Calling for Epidemiological Investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2020 Jul 22;11:1729. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01729
9. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
10. 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.
11. R Core Team, et al. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
12. Baker FB. Stability of two hierarchical grouping techniques case I: sensitivity to data errors. J of the American Statistical Association. 1974;69(346):440-445.
13. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurkdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. J Hosp Infect. 2022 Dec;130:56-62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
- 19-Associated Bacterial Pneumonia in Hospitals of Rostov-on-Don. Public Health and Life Environment – PH&LE. 2021;12:64-71. DOI: 10.35627/2219-5238/2021-29-12-64-71 (In Russian).
4. Pavlovich NV, Tsymbalistova MV, Aronova NV, Anisimova AS, Vodopyanov SO, Vodopyanov AS, et al. Community-Acquired Pneumonia of Bacterial Etiology and the Spectrum of Pathogen Sensitivity to Antibiotics in Corona-Positive and Corona-Negative Patients in Rostov-on-Don. Antibiotics and Chemotherapy. 2021;66(1-2):26-32. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-1-2-26-32 (In Russian).
5. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Clin Microbiol Infect. 2018 Apr;24(4):335-341. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.013
6. Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, et al. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. J Hosp Infect. 2018 Mar;98(3):282-288. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.12.005
7. Kovalevich AA, Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Temyakova SU. INDEL-typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains. Bacteriology. 2024;9(4):75-81. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81 (In Russian).
8. Blanc DS, Magalhães B, Koenig I, Senn L, Grandbastien B. Comparison of Whole Genome (wg-) and Core Genome (cg-) MLST (BioNumericsTM) Versus SNP Variant Calling for Epidemiological Investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2020 Jul 22;11:1729. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01729
9. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
10. Kovalevich AA, Vodopyanov AS, Pisanov RV. Computer program "Pseudomonas Analyser – a program for analyzing the data of whole – genome sequencing of the causative agent of pseudomonas infection". Certificate of state registration No 2023667063 dated 08/09/2023. (In Russian).
11. R Core Team, et al. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
12. Baker FB. Stability of two hierarchical grouping techniques case I: sensitivity to data errors. J of the American Statistical Association. 1974;69(346):440-445.
13. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurkdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. J Hosp Infect. 2022 Dec;130:56-62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012

References

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 Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора
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 Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Геномы штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов многопрофильных стационаров в Республике Беларусь в 2016–2022 гг.

А.Е.Соломенцева¹, Е.В.Карпова², М.В.Фурсов¹, Д.В.Волков¹, А.А.Кисличкина¹,
Л.А.Шишкина¹, Д.В.Тапальский², Н.К.Фурсова¹

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

²ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Представлены данные о результатах полногеномного секвенирования 140 клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в 2016–2022 гг. в четырех лечебных учреждениях Республики Беларусь. Показано, что все полученные полногеномные последовательности удовлетворяют общепринятым критериям оценки качества геномных сборок. Наиболее представленным (51,5%) среди 12 идентифицированных сиквенса-типов был ST395.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, *Klebsiella pneumoniae*, Республика Беларусь

Для цитирования: Соломенцева А.Е., Карпова Е.В., Фурсов М.В., Волков Д.В., Кисличкина А.А., Шишкина Л.А., Тапальский Д.В., Фурсова Н.К. Геномы штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов многопрофильных стационаров в Республике Беларусь в 2016–2022 гг. Бактериология. 2025; 10(2): 74–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-74-78

Genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients of multidisciplinary hospitals in the Republic of Belarus in 2016–2022

A.E.Solomentseva¹, E.V.Karpova², M.V.Fursov¹, D.V.Volkov¹, A.A.Kislichkina¹,
L.A.Shishkina¹, D.V.Tapalsky², N.K.Fursova¹

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

²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

The results of whole-genome sequencing of 140 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains, isolated in 2016–2022 in four healthcare institutions of the Republic of Belarus, are presented. It is shown that all obtained whole-genome sequences meet the generally accepted criteria for assessing the quality of genome assemblies. Among the 12 identified sequence types, ST395 was the most prevalent.

Key words: whole genome sequencing, *Klebsiella pneumoniae*, Republic of Belarus

For citation: Solomentseva A.E., Karpova E.V., Fursov M.V., Volkov D.V., Kislichkina A.A., Shishkina L.A., Tapalsky D.V., Fursova N.K. Genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients of multidisciplinary hospitals in the Republic of Belarus in 2016–2022. Bacteriology. 2025; 10(2): 74–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-74-78

Для корреспонденции:

Соломенцева Александра Евгеньевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Статья поступила 12.05.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Aleksandra E. Solomentseva, Junior Researcher, Culture Collections 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

The article was received 12.05.2025, accepted for publication 30.06.2025

K *lebsiella pneumoniae* – один из основных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в мире, выявляемый в 16–26% случаев госпитальных инфекций в Российской Федерации и в 14% случаев в Республике Беларусь [1–3]. Бактерии данного вида вызывают также и внебольничные инфекции различной локализации, в т.ч. пневмонию, сепсис, инфекции мочевыводящих путей, кожи, мягких тканей и др. [4, 5]. Штаммы *K. pneumoniae* характеризуются значительной генетической и фенотипической гетерогенностью, подразделяются на две эволюционно-генетические линии: классические *K. pneumoniae* (сКр) и гипервирулентные *K. pneumoniae* (hvКр) [6]. Клиническая значимость сКр тесно связана с феноменом быстрого распространения штаммов со множественной (MDR), экстремальной и пан-резистентностью, т.е. с устойчивостью ко многим или всем потенциально используемым в антибиотикотерапии препаратам (β-лактамам, включая карбапенемы, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, полимиксином и др.) [7]. *K. pneumoniae* включены в состав группы бактерий ESKAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), представляющих значительную угрозу всемирному здравоохранению, которая усугубилась во время всемирной пандемии SARS-CoV-2 [8]. Штаммы hvКр характеризуются гипервирулентностью, ассоциированной с гипермукоидным фенотипом, повышенной способностью к биопленкообразованию, набором специфических генетических детерминант вирулентности (регулятор синтеза капсульных полисахаридов *trpA*; кластеры генов, определяющих капсульные типы K1,

K2, K5, K20, K57 и др.; гены сидерофоров энтеробактина, ерсиниабактина, салмохелина и азробактина; гены транспортной системы железа *kfu*, транспортера *Peg-344* и метаболизующей системы аллантина *allSR*) [9]. В последние годы появилось много фактов о продолжающейся эволюции *K. pneumoniae*, вследствие которой происходит объединение сКр и hvКр эволюционных ветвей данного патогена: описаны «гибридные формы» MDR-hvКр, характеризующиеся одновременно мультирезистентностью и гипервирулентностью [10, 11].

Появление и распространение клонов высокого риска, горизонтальный перенос плазмид, несущих множественные генетические детерминанты антибиотикорезистентности, формирование сложных многокомпонентных генетических островов в геномах эпидемических штаммов – механизмы, лежащие в основе возникновения современных штаммов *K. pneumoniae*, описанных в разных регионах мира, в т.ч. в Российской Федерации и Республике Беларусь [12–15].

Целью данной работы было получение и описание полногеномных последовательностей штаммов *K. pneumoniae* ($n = 140$), выделенных в 2016–2022 гг. в четырех лечебных учреждениях Республики Беларусь: Гомельской областной туберкулезной клинической больницы, г. Гомель ($n = 60$); Республиканском научно-практическом центре пульмонологии и фтизиатрии, г. Минск ($n = 31$); Витебской областной клинической больницы, г. Витебск ($n = 42$) и Могилевской больнице №1, г. Могилев ($n = 7$).

ДНК выделяли с использованием набора DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Хильден, Германия). Полногеномное секвенирование проводили на платформе GenoLab M, с использованием набора SG GM Plus («Сесана», Москва, Россия). Полученные единичные прочтения собирали в контиги с использованием программы Unicycler 0.5.0 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Собранные *de novo* геномы аннотировали в базу данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Оценку качества собранных контигов проводили с помощью алгоритма CheckM2 (<https://github.com/chklovski/CheckM2>). MLST-типирование осуществляли по схеме BIGSdb (<https://pubmlst.org/software/bigsdb>) с помощью алгоритма *mlst* (<https://github.com/tseemann/mlst>). Филогенетический анализ проводили с помощью программ *Andi*, *FastME* и *GrapeTree* (<https://github.com/EvolBioInf/andi>, <https://gite.lirmm.fr/atgc/FastME/>, <https://github.com/achtman-lab/GrapeTree>).

Показано, что все полученные полногеномные последовательности удовлетворяют общепринятым критериям оценки качества геномных сборок, а именно: 1) полнота генома (процент покрытия полной генетической последовательности данного микроорганизма) составила >99,9%; 2) загрязнение генома (процент присутствия в секвенированном геноме чужеродной ДНК) находилось на уровне <2% [16]; 3) размеры геномов находились в диапазоне 5 390 002–5 780 256 п.о.; 4) значения GC-состава геномов составили 0,56–0,57%, что соответствует рекомендуемым значениям для *K. pneumoniae* (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/genomes-quality-criteria/>) (таблица).

Наиболее представленным среди 12 сиквенс-типов был ST395 (51,5%), далее по убыванию – ST512 (16,4%), ST147 (9,3%), ST23 (9,3%), ST307 (4,3%), ST101 (3,6%), ST874

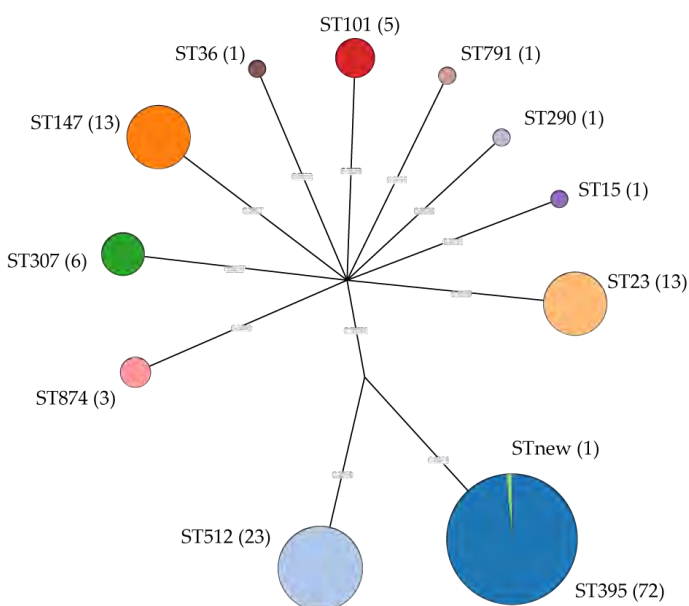


Рисунок. Филогенетическое дерево, построенное на основании 140 полногеномных последовательностей штаммов *K. pneumoniae* с помощью алгоритмов *Andi*, *FastME* и *GrapeTree* (<https://github.com/EvolBioInf/andi>, <https://gite.lirmm.fr/atgc/FastME/>, <https://github.com/achtman-lab/GrapeTree>).

Figure. Phylogenetic tree constructed based on 140 whole genome sequences of *K. pneumoniae* strains using the *Andi*, *FastME* and *GrapeTree* algorithms (<https://github.com/EvolBioInf/andi>, <https://gite.lirmm.fr/atgc/FastME/>, <https://github.com/achtman-lab/GrapeTree>).

Таблица. Геномы штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из разных источников на территории Республики Беларусь в 2016–2022 гг.
Table. Genomes of *K. pneumoniae* strains isolated from different sources in the Republic of Belarus in 2016–2022

Город / City	Источник / Source of isolation	Годы / Years	Код доступа генома в базе данных GenBank / Genome access code in GenBank	ST (кол-во) / ST database (qty)	Полнота генома, % / Genome completeness, %	Загрязнение генома, % / Genome contamination, %	Размер генома, п.о. / Genome size, bp	GC состав, % / GC composition, %	Кол-во контигов / Number of contigs
Витебск / Vitebsk	Дыхательная система / Respiratory system	2016	SAMN48357025, SAMN48357027, SAMN48357028, SAMN48357029, SAMN48357030, SAMN48357032, SAMN48357033, SAMN48357034, SAMN48357035	395 (8), new (1)	100	0,18–0,77	5390002– 5520130	0,57	137–400
		2020	SAMN48356994, SAMN48356995, SAMN48356996, SAMN48356997, SAMN48356998, SAMN48356999, SAMN48357000, SAMN48357001, SAMN48357002, SAMN48357003, SAMN48357004, SAMN48357010, SAMN48357011, SAMN48357012, SAMN48357013, SAMN48357015, SAMN48357016, SAMN48357017, SAMN48357018, SAMN48357019, SAMN48357020, SAMN48357021, SAMN48357022, SAMN48357023	23 (9), 101 (1), 395 (12), 512 (1), 874 (1)	99,95–100	0,05–0,88	5364239– 5866057	0,56–0,57	146–490
		2016	SAMN48357024, SAMN48357031	395 (2)	99,98–100	0,41–0,52	5387334– 5516209	0,57	233–465
		2020	SAMN48357005, SAMN48357007, SAMN48357008, SAMN48357009, SAMN48357014, SAMN48357006	23 (1), 395 (3), 874 (2)	100	0,13–0,49	5491553– 5837588	0,57	174–320
		2016	SAMN48357026	395 (1)	100	0,26	5459496	0,57	137
Гомель / Gomel	Дыхательная система / Respiratory system	2021	SAMN48357074, SAMN48357076, SAMN48357079, SAMN48357080	147 (1), 395(3)	99,99–100	0,53–0,68	5347409– 5860259	0,57	220–363
		2022	SAMN48357081, SAMN48357082, SAMN48357084, SAMN48357085, SAMN48357086, SAMN48357087, SAMN48357089, SAMN48357091, SAMN48357092, SAMN48357093, SAMN48357096, SAMN48357098, SAMN48357099, SAMN48357100, SAMN48357101, SAMN48357102, SAMN48357109, SAMN48357111, SAMN48357113, SAMN48357114, SAMN48357115, SAMN48357116, SAMN48357119, SAMN48357120, SAMN48357121, SAMN48357122, SAMN48357123, SAMN48357124, SAMN48357125, SAMN48357127, SAMN48357128, SAMN48357130, SAMN48357131, SAMN48357133	36 (1), 101 (10), 147 (3), 307 (1), 395 (16), 512 (11), 791 (1)	99,94–100	0,11–2,02	5315583– 5882144	0,56–0,57	121–574
		2022	SAMN48357107	395 (1)	100	0,29	5374208	0,57	143
		2022	SAMN48357132	395 (1)	100	1,1	5744632	0,56	564
		2021	SAMN48357075, SAMN48357077, SAMN48357078	395 (2), 512 (1)	100	0,2–0,67	5408403– 5676486	0,57	185–202
Минск / Minsk	Дыхательная система / Respiratory system	2022	SAMN48357083, SAMN48357088, SAMN48357090, SAMN48357094, SAMN48357095, SAMN48357097, SAMN48357103, SAMN48357104, SAMN48357105, SAMN48357106, SAMN48357108, SAMN48357110, SAMN48357112, SAMN48357117, SAMN48357118, SAMN48357126, SAMN48357129	15 (1), 101 (1), 147 (1), 395 (6), 512 (8)	100	0,05–0,97	5303670– 5806661	0,56–0,57	99–408
		2022	SAMN48357043, SAMN48357044, SAMN48357045, SAMN48357046, SAMN48357047, SAMN48357048, SAMN48357049, SAMN48357050, SAMN48357051, SAMN48357052, SAMN48357053, SAMN48357054, SAMN48357055, SAMN48357056, SAMN48357057, SAMN48357058, SAMN48357059, SAMN48357060, SAMN48357061, SAMN48357062, SAMN48357063, SAMN48357066, SAMN48357067, SAMN48357068, SAMN48357070, SAMN48357071, SAMN48357072, SAMN48357073	23 (3), 101 (2), 147 (6), 290 (1), 307 (4), 395 (12)	99,93–100	0,14–1,26	5291925– 5883813	0,56–0,57	150–540
		2022	SAMN48357064, SAMN48357065, SAMN48357069	147 (2), 307 (1)	100	0,55–1,65	5719833– 5791405	0,57	119–353
		2021	SAMN48357036, SAMN48357037, SAMN48357038, SAMN48357040, SAMN48357042	395 (4), 512 (1)	100	0,3–0,57	5274483– 5705806	0,57	162–336
		2021	SAMN48357039, SAMN48357041	395 (1), 512 (1)	100	0,37–0,49	5729686– 5780256	0,57	194–280

(2,1%); остальные (ST36, ST791, ST290, ST15 и ранее не описанный новый ST) – по 1 штамму (рисунок).

Полученные данные представляют интерес для клиницистов, эпидемиологов и молекулярных биологов с точки зрения оценки современной эпидемиологической ситуации в Республике Беларусь, сравнения ее с таковой в Российской Федерации и в мире.

Информация о финансировании

Секвенирование штаммов *K. pneumoniae* выполнено в рамках: федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Financial support

Sequencing of *K. pneumoniae* strains was carried out within the framework of the federal project “Sanitary Shield – safety for health (prevention, detection, response)”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Информация об исследованиях, где в качестве объектов выступали люди

В соответствии с требованиями Биоэтического комитета Российской Федерации в работе использованы клинические штаммы *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 strains of *K. pneumoniae* without specifying personal data of patients, such as name, date of birth, address, medical history, etc.

Литература

1. Карноух КИ, Лазарева НБ. Оценка рациональности антибактериальной терапии внутрибольничных инфекций у пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии на фоне COVID-19: ретроспективный анализ. Безопасность и риск фармакотерапии. 2022;10(3):269-282. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-278
2. Бычинин МВ, Антонов ИО, Клыпа ТВ, Мандель ИА, Минец АИ, Колышкина НА, и др. Нозокомиальная инфекция у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19. Общая реаниматология. 2022;18(1):4-10. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-1-4-10
3. Довнар РИ, Федянин СД, Окулич ВК, Конопелько ЕА, Ставчиков ЕЛ. Анализ этиологической структуры микрофлоры у пациентов с гнойными ранами в различных регионах Республики Беларусь. Вестник НМХЦ им. Н.И.Пирогова. 2025;20(1):94-97. DOI: 10.25881/20728255_2025_20_1_94
4. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
5. Liu YN, Zhang YF, Xu Q, Qiu Y, Lu QB, Wang T, et al. Infection and co-infection patterns of community-acquired pneumonia in patients of different ages in China from 2009 to 2020: a national surveillance study. Lancet Microbe. 2023;4(5):e330-e339. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00031-9
6. Parrott AM, Shi J, Aaron J, Green DA, Whittier S, Wu F. Detection of multiple hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a New York City hospital through

screening of virulence genes. Clin Microbiol Infect. 2021;27(4):583-589. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.012

7. Hussein RA, Al-Kubaisy SH, Al-Ouqaili MTS. The influence of efflux pump, outer membrane permeability and β -lactamase production on the resistance profile of multi, extensively and pandrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. J Infect Public Health. 2024;17(11):102544. DOI: 10.1016/j.jiph.2024.102544
8. Sakalauskienė GV, Malcienė L, Stankevičius E, Radzevičienė A. Unseen enemy: mechanisms of multidrug antimicrobial resistance in gram-negative ESKAPE pathogens. Antibiotics (Basel). 2025;14(1):63. DOI: 10.3390/antibiotics14010063
9. Tian T, Han H, Guan ZH, Zhang K, Huang X, Wang W, et al. A systematic review of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* research: bibliometric and topic modeling perspectives. Front Med (Lausanne). 2025;12:1545678. DOI: 10.3389/fmed.2025.1545678
10. Zheng Y, Zhu X, Ding C, Chu W, Pang X, Zhang R, et al. Multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an evolving superbug. Future Microbiol. 2025;20(6):499-511. DOI: 10.1080/17460913.2025.2482478
11. Shapovalova VV, Chulkova PS, Ageevets VA, Nurmukanova V, Verentsova IV, Girina AA, et al. High-risk lineages of hybrid plasmids carrying virulence and carbapenemase genes. Antibiotics (Basel). 2024;13(12):1224. DOI: 10.3390/antibiotics13121224
12. Muteeb G, Kazi RNA, Aatif M, Azhar A, Oirdi ME, Farhan M. Antimicrobial resistance: Linking molecular mechanisms to public health impact. SLAS Discov. 2025;33:100232. DOI: 10.1016/j.slasd.2025.100232
13. Kuzina ES, Novikova TS, Astashkin EI, Fedyukina GN, Kislichkina AA, Kurdyumova NV, et al. Rectal and tracheal carriage of carbapenemase genes and class 1 and 2 integrons in patients in neurosurgery intensive care unit. Antibiotics (Basel). 2022;11(7):886. DOI: 10.3390/antibiotics11070886
14. 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
15. Tapalski DV, Timoshkova EV, Petrovskaya TA, Osipkina OV, Karpov IA. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Klin Lab Diagn. 2021;66(5):304-309. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309
16. Riesco R, Trujillo ME. Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol. 2024;74(3):006300. DOI: 10.1099/ijsem.0.006300

References

1. Karnoukh KI, Lazareva NB. Evaluation of the Rationality of Antibiotic Therapy of Nosocomial Infections in Resuscitation and Intensive Care Patients with COVID-19: a Retrospective Analysis. Safety and Risk of Pharmacotherapy. 2022;10(3):269-282. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-278 (In Russian).
2. Bychinin MV, Antonov IO, Klypa TV, Mandel IA, Minets AI, Kolyshkina NA, et al. Nosocomial Infection in Patients with Severe and Critical COVID-19. General Reanimatology. 2022;18(1):4-10. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-1-4-10 (In Russian).
3. Dovnar RI, Fedzianin SD, Okulich VK, Konopelko EA, Stavchikov EL. Analysis of the etiological structure of microflora in patients with purulent wounds in various regions of the Republic of Belarus. Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center. 2025;20(1):94-97. DOI: 10.25881/20728255_2025_20_1_94 (In Russian).
4. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
5. Liu YN, Zhang YF, Xu Q, Qiu Y, Lu QB, Wang T, et al. Infection and co-infection patterns of community-acquired pneumonia in patients of different ages in China from 2009 to 2020: a national surveillance study. Lancet Microbe. 2023;4(5):e330-e339. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00031-9

6. Parrott AM, Shi J, Aaron J, Green DA, Whittier S, Wu F. Detection of multiple hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a New York City hospital through screening of virulence genes. Clin Microbiol Infect. 2021;27(4):583-589. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.012
7. Hussein RA, Al-Kubaisy SH, Al-Ouqaili MTS. The influence of efflux pump, outer membrane permeability and β -lactamase production on the resistance profile of multi, extensively and pandrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. J Infect Public Health. 2024;17(11):102544. DOI: 10.1016/j.jiph.2024.102544
8. Sakalauskiene GV, Malcienė L, Stankevičius E, Radzevičienė A. Unseen enemy: mechanisms of multidrug antimicrobial resistance in gram-negative ESKAPE pathogens. Antibiotics (Basel). 2025;14(1):63. DOI: 10.3390/antibiotics14010063
9. Tian T, Han H, Guan ZH, Zhang K, Huang X, Wang W, et al. A systematic review of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* research: bibliometric and topic modeling perspectives. Front Med (Lausanne). 2025;12:1545678. DOI: 10.3389/fmed.2025.1545678
10. Zheng Y, Zhu X, Ding C, Chu W, Pang X, Zhang R, et al. Multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an evolving superbug. Future Microbiol. 2025;20(6):499-511. DOI: 10.1080/17460913.2025.2482478
11. Shapovalova VV, Chulkova PS, Ageevets VA, Nurmukanova V, Verentsova IV, Girina AA, et al. High-risk lineages of hybrid plasmids carrying virulence and carbapenemase genes. Antibiotics (Basel). 2024;13(12):1224. DOI: 10.3390/antibiotics13121224
12. Muteeb G, Kazi RNA, Aatif M, Azhar A, Oirdi ME, Farhan M. Antimicrobial resistance: Linking molecular mechanisms to public health impact. SLAS Discov. 2025;33:100232. DOI: 10.1016/j.slasd.2025.100232
13. Kuzina ES, Novikova TS, Astashkin EI, Fedyukina GN, Kislichkina AA, Kurdyumova NV, et al. Rectal and tracheal carriage of carbapenemase genes and class 1 and 2 integrons in patients in neurosurgery intensive care unit. Antibiotics (Basel). 2022;11(7):886. DOI: 10.3390/antibiotics11070886
14. Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Aksenova 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).
15. Tapalski DV, Timoshkova EV, Petrovskaya TA, Osipkina OV, Karpov IA. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Klin Lab Diagn. 2021;66(5):304-309. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309
16. Riesco R, Trujillo ME. Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol. 2024;74(3):006300. DOI: 10.1099/ijsem.0.006300

Информация о соавторах:

Карпова Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая Центром медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Волков Даниил Владимирович, 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

Шишкина Лидия Алексеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Тапальский Дмитрий Викторович, доктор медицинских наук, профессор, директор ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

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

Information about co-authors:

Elena V. Karpova, PhD, MD, Associate Professor, Head of the Center for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Culture Collections Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Daniil V. Volkov, Junior Researcher, Culture Collections Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Angelina A. Kislichkina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Culture Collections Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Lidia A. Shishkina, PhD in Biological Sciences, Researcher, Culture Collections Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Dmitry V. Tapalsky, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Molecular Microbiology Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus*, ассоциированных со вспышками пищевой инфекции в Российской Федерации

И.В.Абаев, Ю.П.Скрябин, Д.М.Лощинин, М.А.Евсеева, А.Д.Фурсова, И.П.Мицевич, Е.Э.Люлина, А.А.Сизова, Т.Н.Мухина

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

Целью исследования является характеристика популяционной структуры токсигенных штаммов *Staphylococcus aureus*, ассоциированных с массовыми вспышками стафилококковой пищевой токсикоинфекции (ПТИ) на территории Российской Федерации.

Для анализа использовали штаммы *S. aureus*, идентифицированные при расследовании подтвержденных вспышек с убедительными эпидемиологическими доказательствами. Геномные последовательности штаммов *S. aureus* анализировали для определения сиквенс-типов и профилей генов энтеротоксинов с использованием программ *mlst* 2.23.0 и *abricate* v. 1.0.1. Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* – возбудителей вспышек ПТИ строили с помощью программы *snippy* v. 4.6.0, *iqtree2* v.2.4.0 и *iTOL* v. 7.2.

В работе охарактеризованы эпидемически значимые штаммы *S. aureus* – возбудители ПТИ, продемонстрированы быстрые эволюционные изменения популяционной структуры токсигенных штаммов *S. aureus*, этиологических агентов пищевой токсикоинфекции. Выявлены новые доминирующие генетические линии *S. aureus* CC5 ST6 и CC8 среди возбудителей стафилококковой ПТИ, циркулирующих в России. Показана возможность изоляции различных штаммов *S. aureus* – возбудителей ПТИ в одном очаге инфекции.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, стафилококковая пищевая токсикоинфекция, филогенетический анализ, стафилококковые энтеротоксины

Для цитирования: Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Лощинин Д.М., Евсеева М.А., Фурсова А.Д., Мицевич И.П., Люлина Е.Э., Сизова А.А., Мухина Т.Н. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus*, ассоциированных со вспышками пищевой инфекции в Российской Федерации. Бактериология. 2025; 10(2): 79–86. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-79-86

Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains associated with foodborne infection outbreaks in the Russian Federation

I.V.Abaev, Y.P.Skryabin, D.M.Loschinin, M.A.Evseeva, A.D.Fursova, I.P.Mitsevich, E.E.Lyulina, A.A.Sizova, T.N.Mukhina

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

The aim of this study is to characterize the population structure of toxigenic *Staphylococcus aureus* strains associated with mass outbreaks of staphylococcal food poisoning (SFP) in the Russian Federation.

S. aureus strains identified during study of confirmed outbreaks with consistent epidemiological evidence were used for analysis. Genomic sequences of *S. aureus* strains were analyzed to determine sequencing types and enterotoxin gene profiles using *mlst* 2.23.0 and *abricate* v. 1.0.1. The phylogenetic tree of *S. aureus* strains, causative agents of SFP outbreaks, was constructed using the programs *snippy* v. 4.6.0, *iqtree2* v.2.4.0 and *iTOL* v. 7.2.

Epidemically important strains of *S. aureus*, causative agents of SFP, were characterized, and rapid evolutionary changes in the population structure of toxigenic *S. aureus* strains, etiologic agents of SFP, were demonstrated. New dominant genetic clones of *S. aureus* CC5 ST6 and CC8 among the SFP etiological agents circulating in the Russian Federation have been revealed. The presence of different *S. aureus* strains, SFP etiological agents, in one infection site has been shown.

Key words: *Staphylococcus aureus*, staphylococcal food poisoning, phylogenetic analysis, staphylococcal enterotoxins

Для корреспонденции:

Абаев Игорь Валентинович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
E-mail: abaev@obolensk.org

Статья поступила 01.05.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Igor V. Abaev, PhD, MD, Leading Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
E-mail: abaev@obolensk.org

The article was received 01.05.2025, accepted for publication 30.06.2025

For citation: Abaev I.V., Skryabin Y.P., Loschin D.M., Evseeva M.A., Fursova A.D., Mitsevich I.P., Lyulina E.E., Sizova A.A., Mukhina T.N. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains associated with foodborne infection outbreaks in the Russian Federation. Bacteriology. 2025; 10(2): 79–86. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-79-86

Бактерия *Staphylococcus aureus* обладает полиорганном тропизмом и, будучи комменсалом кожных покровов и слизистых оболочек человека, способна инициировать широкий спектр инфекционных заболеваний различной степени тяжести – от поверхностных кожных до системных инвазивных инфекций, таких как эндокардит, пневмония, сепсис, остеомиелит и др. [1]. Значительную долю в структуре инфекционных заболеваний, обусловленных *S. aureus*, занимают пищевые токсикоинфекции (ПТИ). Стафилококковая ПТИ определяется как гастроэнтерологическое заболевание, развивающееся вследствие употребления пищевых продуктов, загрязненных энтеротоксинами, которые продуцируются токсигенными штаммами *S. aureus*. Клиническая картина ПТИ связана с поражением верхних отделов желудочно-кишечного тракта и развивается в течение нескольких часов. Наиболее частые симптомы – тошнота, сильная рвота, боли в животе и повышенное слюноотделение, сопровождающиеся или не сопровождающиеся диареей. Токсикоинфекция без лечения проходит за 24–48 ч после первых симптомов, но нередко протекает в тяжелой форме, особенно в группах риска (дети, люди старшего возраста и иммунокомпрометированные пациенты).

Стафилококковая ПТИ занимает лидирующие позиции в структуре этиологических причин пищевых инфекций и отравлений на глобальном уровне, демонстрируя как спорадическую, так и эпидемическую распространенность. По данным мировой статистики, стафилококковые ПТИ занимают третье ранговое место среди всех зарегистрированных пищевых инфекций [2, 3].

В Российской Федерации отсутствует систематическая регистрация случаев стафилококковых ПТИ. При этом в США ежегодно регистрируется ~241 000 случаев ПТИ, обусловленных *S. aureus* [4]. Существующие данные свидетельствуют, что реальная частота стафилококковых ПТИ сильно занижена, что обусловлено сложностями в дифференциальной диагностике, вследствие чего многочисленные спорадические эпизоды и небольшие вспышки ПТИ не регистрируются [5, 6].

Все патогенные штаммы *S. aureus*, вызывающие стафилококковую ПТИ, продуцируют разнообразные энтеротоксины, которые определяют специфическую клиническую картину и патогенез заболевания. Механизм действия энтеротоксинов реализуется через селективное нарушение проницаемости капиллярных стенок эпителия тонкого кишечника и воздействие на эметический центр головного мозга, что клинически проявляется тошнотой и рвотой. Энтеротоксины проявляют свойства суперантигенов, индуцируя неспецифическую пролиферацию Т-лимфоцитов. Синтез энтеротоксинов осуществляется в логарифмической фазе роста возбудителя или при переходе из экспоненциальной в стационарную фазу [7]. Энтеротоксины демонстрируют высокую резистентность к различным факторам внешней среды, включая значительные колебания температуры, высушивание и низ-

кие значения pH [3]. Энтеротоксины устойчивы к протеолитическим ферментам и сохраняют активность в желудочно-кишечном тракте человека. Их биологическая активность крайне высока: токсический эффект проявляется при концентрациях от нескольких сотен нанограмм до микрограммов, причем для развития клинической картины ПТИ достаточно дозы 0,1 мкг энтеротоксина [8].

Эпидемиологический анализ показывает преобладание метициллин-чувствительных штаммов *S. aureus* (methicillin-susceptible *S. aureus*/MSSA) среди возбудителей стафилококковых ПТИ, что может быть обусловлено отсутствием прямого селективного давления антибиотиков на эти штаммы. Крайне важным вопросом эпидемиологии стафилококковой ПТИ является проблема клональной структуры популяции штаммов *S. aureus*, ответственных за ПТИ. Известно, что база данных MLST (Multi-Locus Sequence Typing), основной источник для оценки популяционной структуры микроорганизмов, включает на 2025 г. >9900 сиквенс-типов (Sequence type/ST) *S. aureus*, объединенных в ≥100 клональных комплексов (Clonal complex/CC) [9]. В отношении госпитальных и внегоспитальных метициллин-устойчивых штаммов *S. aureus* (methicillin-resistance *S. aureus*/MRSA) показана выраженная клональность популяции, что часто объясняется тем, что <1% сиквенс-типов *S. aureus* могут быть ассоциированы с фенотипом MRSA, причем наиболее часто сиквенс-типы с фенотипом MRSA относятся к таким клональным комплексам, как CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 и CC45 [10]. При этом в отношении штаммов MSSA предполагается, что для них наиболее типичен панмиксивный вариант популяционной структуры [11].

Тем не менее исследования, посвященные клональной структуре штаммов MSSA, ассоциированных с пищевой инфекцией в различных регионах мира, таких как Испания, Япония и Китай, часто демонстрируют принадлежность штаммов, выделенных при расследовании вспышек ПТИ, к наиболее известным клональным комплексам, характерным для госпитальных и внегоспитальных штаммов MRSA [12–14]. Знания о клональности штаммов *S. aureus*, ассоциированных с ПТИ на территории России, ограничены и включают данные, полученные в «доковидную» эпоху [15–17]. Актуальность клонального анализа штаммов *S. aureus*, изолированных в последние годы в связи с расследованием вспышек ПТИ в России, обуславливается, в частности, изменением эпидемического профиля большинства инфекций после эпидемии ковида [18].

Целью исследования является характеристика популяционной структуры токсигенных штаммов *S. aureus*, ассоциированных со вспышками стафилококковой ПТИ на территории Российской Федерации.

Материалы и методы

В исследование были включены штаммы *S. aureus* – возбудители ПТИ, изолированные при расследовании пищевых

вспышек в референс-центре по мониторингу за стафилококковыми инфекциями ФБУН ГНЦ ПМБ. ДНК для проведения полногеномного секвенирования выделяли с помощью набора DNA minikit (BioFact, Республика Корея). Библиотеки готовили с использованием набора MGIEasy FS DNA Library Prep Ki (MGI Tech Co, Китай). Секвенирование осуществляли на платформе MGISeq-2000 (MGI Tech Co, Китай) с использованием набора 2000RS High-throughput Sequencing Kit PE200 (MGI Tech Co, Китай) согласно инструкции производителя.

Сборку ридов проводили с помощью Unicycler v. 0.5.0 с параметрами по умолчанию [19]. Сиквенс-типы определяли с помощью программы mlst 2.23.0 [20]. Для поиска генов вирулентности использовали программу abricate v. 1.0.1 [21]. Единичные нуклеотидные замены (SNP) в коровом (англ. core – ядро) геноме определяли с использованием snippy v. 4.6.0 [22], филогенетическое дерево на их основе построено с использованием программы iqtree2 v. 2.4.0 [23], визуализация – iTOL v. 7.2 [24].

Результаты исследования и их обсуждение

S. aureus широко представлен в экологических нишах, тесно связанных с человеком и средой его обитания, и часто присутствует в клинических образцах как сопутствующая микрофлора. Сам факт выделения культуры из клинического материала не может считаться доказательством стафилококкового характера инфекционной вспышки [23]. Все это серьезно осложняет расследование вспышек стафилококковой ПТИ.

Ежегодно в Федеральный референс-центр по мониторингу за стафилококковыми инфекциями (ФБУН ГНЦ ПМБ) поступают на исследование сотни образцов биоматериалов, выделенных при вспышках острых инфекционных кишечных заболеваний с подозрением на стафилококковую природу инфекции. Так, в 2023–2024 гг. в референс-центр поступили на исследование материалы, полученные при расследовании 61 вспышки из 32 регионов Российской Федерации, включая западные и центральные регионы европейской части страны, Урал, Сибирь и Дальний Восток.

Основной задачей расследования вспышки ПТИ в референс-центре является определение стафилококкового характера вспышки и выявление эпидемиологической связи между изолятами *S. aureus*. Такое расследование требует специфического алгоритма доказательного анализа геномных и эпидемиологических данных. Алгоритм направлен на подтверждение этиологической роли предполагаемого возбудителя при расследовании ПТИ путем выделения идентичных изолятов *S. aureus* из биоматериала, разделенного на четыре категории: а) выделенные от заболевших, б) выделенные из продуктов питания, в) выделенные от сотрудников организации, связанной с производством пищевых продуктов, г) выделенные из объектов окружающей среды при производстве пищевых продуктов. Наиболее важными для определения вспышки ПТИ как стафилококковой является выделение идентичных изолятов *S. aureus* из материала, полученного от больных (рвотные массы, фекалии, промывочные воды). Только идентификация среди изучаемых изолятов, выделенных от заболевших, специфического штамма *S. aureus* с молекулярно-генетическими характеристиками, соответствующими профилю возбудителя стафилококковой

токсикоинфекции, позволяет признать расследуемую вспышку как пищевую вспышку стафилококкового происхождения.

Следует отметить, что при расследовании вспышек стафилококковых ПТИ в референс-центр крайне редко поступает биоматериал всех четырех или трех вышеупомянутых категорий. По этой причине только 23 вспышки ПТИ за 2013–2024 гг. можно отнести к подтвержденным вспышкам с убедительными эпидемиологическими доказательствами (табл. 1). Вспышка считалась подтвержденной, если штамм возбудителя ПТИ был обнаружен в клиническом материале, полученном от заболевших, в пищевом продукте, употреблявшемся заболевшими, а также в пробах от сотрудников пищеблока и/или в пробах с поверхностей пищеблока.

Для изучения клональной принадлежности изолятов *S. aureus* использовали данные полногеномного секвенирования. С помощью биоинформатического анализа изучали степень близости изолятов *S. aureus*, выделенных в пределах одной вспышки, и определяли характеристики специфического штамма *S. aureus*, ответственного за ПТИ. Именно полнота эпидемиологических доказательств позволяет определить идентичные изоляты *S. aureus*, выявленные при расследовании подтвержденной вспышки, как представителей штамма *S. aureus* – этиологического агента ПТИ.

Все вспышки ПТИ, представленные в исследовании, связаны с употреблением пищи, приготовленной либо на предприятиях общественного питания (всего 13, обозначены как «общепит»), либо непосредственно в пищеблоках образовательных организаций (всего 9, обозначены как «образ. организация»), либо в пищеблоках интернатов/пансионатов (всего 1, обозначены как «интернаты/пансионаты») (табл. 1).

В 2015 г. при расследовании вспышки ПТИ нами впервые было выявлено присутствие в очаге инфекции двух близкородственных штаммов *S. aureus* – по сути, генетических вариантов одного штамма с различным набором энтеротоксинов. Начиная с 2022 г. выявление различных токсигенных штаммов *S. aureus* – этиологических агентов ПТИ при расследовании одной вспышки стало рядовым событием. Всего в четырех из 24 вспышек были выявлены по два близкородственных штамма *S. aureus*, и в четырех одновременно выделялись штаммы *S. aureus*, принадлежащие к различным клональным группам (табл. 1). При этом в одной из вспышек 2023 г. было изолировано три штамма *S. aureus* – возбудителя стафилококковой ПТИ, принадлежащих к двум клональным линиям.

Всего при расследовании 23 подтвержденных вспышек стафилококковой ПТИ было идентифицировано 32 штамма *S. aureus* – этиологических агентов ПТИ (табл. 2). Анализ клональной структуры штаммов *S. aureus* – возбудителей стафилококковой ПТИ на территории России и представленности генов энтеротоксинов проводили с использованием программ mlst 2.23.0 и abricate v. 1.0.1 [20, 21]. Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* – возбудителей вспышек пищевых инфекций в 2013–2024 гг. построено на основе коровых однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных с помощью программы Snippy v. 4.6.0 iqtree2 v.2.4.0 и iTOL v. 7.2. [24] (рисунк).

Ранее, в 2013–2018 гг., нами были выявлены возбудители массовых вспышек ПТИ – эпидемические штаммы *S. aureus*

клональных линий CC1 и CC30 [15–17]. Новые штаммы *S. aureus* клональных линий CC1 и CC30 были изолированы в 2023–2024 гг. Штаммы *S. aureus* CC1 – возбудители ПТИ, циркулирующие на территории России, разделяются на две филогенетические группы: штаммы с кодирующей энтеротоксин В плазмидой и штаммы, способные кодировать гены энтеротоксинов *sea*, *seh*, *selk*, *selq*, но не *seb*. Единственный установленный случай летального исхода стафилококковой ПТИ в России вызван штаммом *S. aureus* 2023_Kur_SE100 из последней группы. Всего идентифицировано семь штаммов CC1, изолированных в пяти вспышках.

Наряду со штаммами *S. aureus* CC30, вызвавшими массовые вспышки ПТИ в 2013–2014 гг., выделены четыре новых штамма *S. aureus* CC30. Для штаммов CC30 характерно наличие генов энтеротоксина А и токсина синдрома токсического шока, но не энтеротоксин-подобных токсинов.

Новые для России эпидемические штаммы *S. aureus* – возбудители ПТИ принадлежат к клональным группам CC5 ST6, CC8 и CC45. Пять близкородственных штаммов

S. aureus CC5 ST6 выделены при расследовании четырех вспышек и характеризуются обязательным наличием гена энтеротоксина А и у части штаммов – генов токсина синдрома токсического шока и энтеротоксин-подобного токсина L. К этой группе принадлежит штамм *S. aureus* 2023_Pkam_DE108, ответственный за самую массовую вспышку ПТИ последних лет. Шесть близкородственных штаммов *S. aureus* CC8 выделили как этиологические агенты пяти массовых вспышек ПТИ в 2019–2024 гг. Ранее клональную группу CC8 не ассоциировали со вспышками ПТИ. Штаммы CC8 характеризуются обязательным наличием гена энтеротоксина А и способностью кодировать различные сочетания генов энтеротоксинов *sed*, *selk*, *selq* и гена токсина синдрома токсического шока. Три штамма *S. aureus* CC45 выделены при расследовании трех вспышек и характеризуются различным сочетанием генов энтеротоксинов *sea*, *sec*, *selk*, *selq* и *sell*.

Штаммы *S. aureus* клональных групп CC5 ST5, CC12, CC22 и CC59 были изолированы как возбудители ПТИ в отдельных вспышках (табл. 2).

Таблица 1. Вспышки подтвержденных стафилококковых пищевых токсикоинфекций по данным расследований референс-центра по мониторингу за стафилококковыми инфекциями в системе Роспотребнадзора
Table 1. Outbreaks of confirmed staphylococcal food poisoning according to investigations by the reference center for monitoring staphylococcal infections in the Rospotrebnadzor system

Год / Year	Регион / Region	Учреждение / Institution	Штаммы / Strains	CC/ST
2013	Ленинградская обл. / Leningrad region	Общепит / public catering	2013_Spb_600	30/30
2014	Хакасия / Khakassia	Общепит / public catering	2014_Abk_3	5/5
2014	Мордовия / Mordovia	Образ. Организация / educational org.	2014_Sar_1752	12/12
2014	Тверская обл. / Tver region	Общепит / public catering	2014_Tvr_33	30/30
2015	Саха (Якутия) / Sakha (Yakutia)	Общепит / public catering	2015_Yak_12434 2015_Yak_12457	1/1 1/1
2018	Саха (Якутия) / Sakha (Yakutia)	Общепит / public catering	2018_Yak_SE61	1/1
2019	Иркутская обл. / Irkutsk region	Образ. организация / educational org.	2019_Irk_DE237	8/5727
2020	Иркутская обл. / Irkutsk region	Образ. организация / educational org.	2020_Irk_JN16	45/1665
2022	Кемеровская обл. / Kemerovo region	Образ. организация / educational org.	2022_Kem_DE35	8/5727
2022	Красноярский край / Krasnoyarsk region	Общепит / public catering	2022_Krs_JU149 2022_Krs_JU154	8/3298 5/3860
2023	Брянская обл. / Bryansk region	Общепит / public catering	2023_Brk_MR179	5/новый
2023	Вологодская обл. / Vologda region	Образ. организация / educational org.	2023_Vol_SE207 2023_Vol_SE208	5/5 30/30
2023	Кировская обл. / Kirov region	Образ. организация / educational org.	2023_Kir_DE126 2023_Kir_DE136 2023_Kir_DE129	5/6 45/45 45/45
2023	Кировская обл. / Kirov region	Образ. организация / educational org.	2023_Kir_NO1228	5/новый
2023	Красноярский край / Krasnoyarsk region	Интернаты/пансионаты / boarding schools/ boarding houses	2023_Krs_MR150 2023_Krs_MR152	8/новый 8/5727
2023	Курская обл. / Kursk region	Общепит / public catering	2023_Kur_SE100 2023_Kur_SE61	1/1 1/1
2023	Камчатская обл. / Kamchatka region	Общепит / public catering	2023_Pkam_DE106 2023_Pkam_DE108	22/22 5/6
2023	Тульская обл. / Tula region	Общепит / public catering	2023_Tul_MR18	1/1
2023	Саха (Якутия) / Sakha (Yakutia)	Образ. организация / educational org.	2023_Yak_JU82	30/30
2024	Иркутская обл. / Irkutsk region	Общепит / public catering	2024_Irk_FE176	8/5727
2024	Марий Эл / Mari El	Общепит / public catering	2024_YOI_JL141	30/30
2024	Ханты-Мансийск / Khanty-Mansiysk	Общепит / public catering	2024_Kh-M_JU764	1/1
2024	Саха (Якутия) / Sakha (Yakutia)	Образ. организация / educational org.	2024_Yak_OC4122024_Yak_OC418	30/30 59/59

Следует отметить, что в ряде европейских стран вспышки ПТИ в основном связаны со штаммами *S. aureus* клональных комплексов CC5 ST5, CC30 и CC45 [12], что вполне соответствовало эпидемиологической картине, выявляемой в России до 2020 г. Выявление штаммов CC5 ST6 при расследовании вспышек ПТИ совпадает с сообщением о первом выделении внутрибольничного клона MRSA CC5 ST6 в России [11]. Появление клонов CC5 ST6 в европейских странах связывают с миграцией из стран Ближнего Востока [25], где отмечается широкое распространение клонов CC5 ST6. Среди госпитальных штаммов *S. aureus*, представители CC8 доминируют на огромной территории от Красноярска до Санкт-Петербурга [26], но до сих пор не была установлена связь штаммов CC8 со вспышками ПТИ.

Заключение

В результате исследования выявлены эпидемически значимые штаммы *S. aureus* – возбудители ПТИ, ранее не ассоциированные с пищевой инфекцией. Продолжающаяся эволюция клональных линий CC5 и CC8 привела к появлению новых доминантных эпидемических штаммов *S. aureus* CC5 ST6 и CC8 ST5727, способных вызывать массовые вспышки ПТИ у здорового контингента. Показано, что штаммы *S. aureus*, ассоциированные с стафилококковой ПТИ, имеют клональную структуру.

Анализ вспышек ПТИ выявил возможность одновременного присутствия в очаге инфекции близкородственных штаммов *S. aureus* – по сути, генетических вариантов одного штамма с различным набором энтеротоксинов. Также в ряде

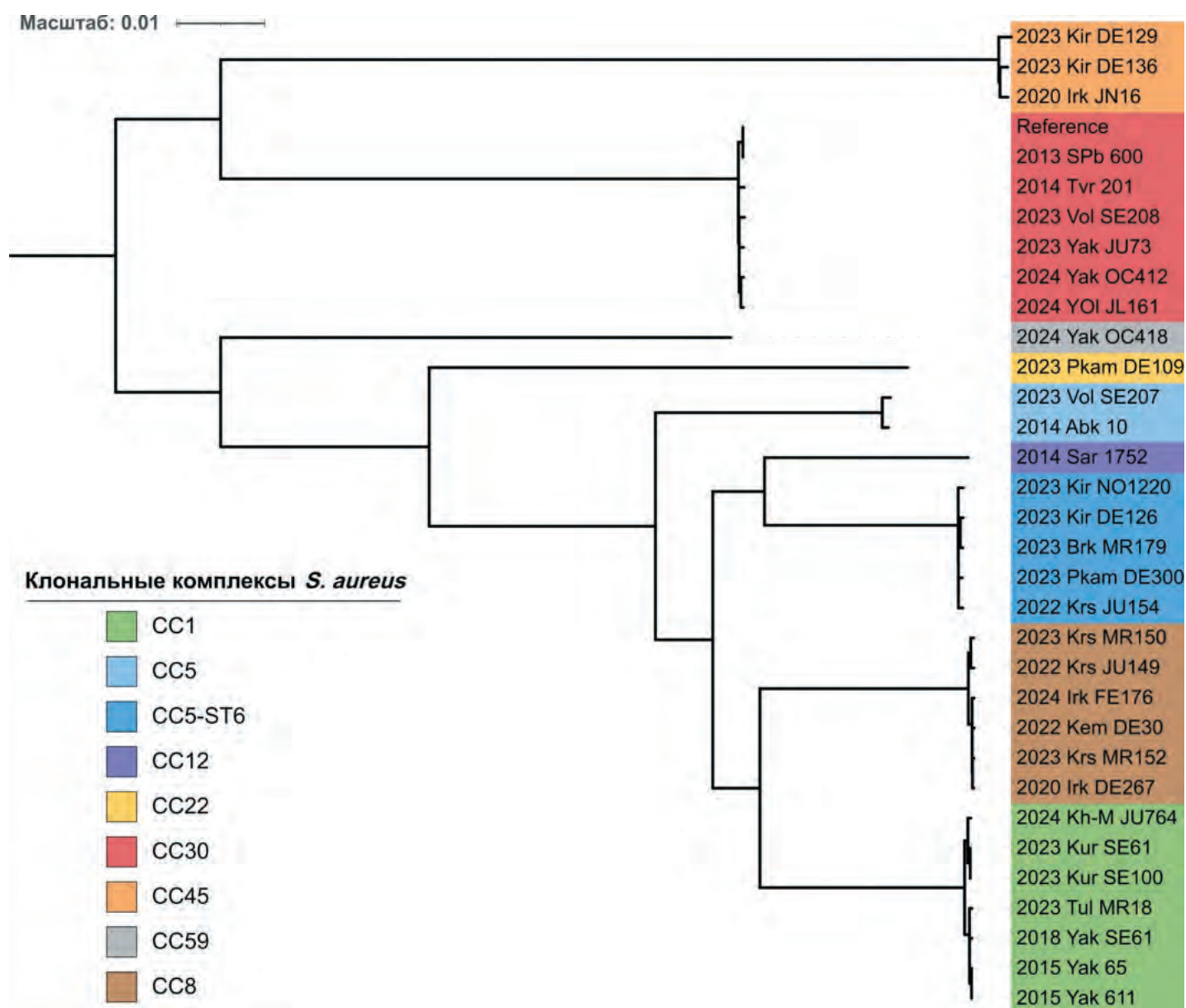


Рисунок. Филогенетическое дерево штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевых инфекций в 2013–2024 гг. в России. Дерево построено с использованием программы iqtree2 v. 2.4.0 на основе 80300 коровых SNP, выявленных с помощью программы snippy v. 4.6.0, визуализация – iTOL v. 7.2.

Figure. Phylogenetic tree of *S. aureus* strains causing foodborne infections in Russia in 2013–2024. The tree was constructed using the iqtree2 v. 2.4.0 program based on 80,300 core SNPs identified using the snippy v. 4.6.0 program, visualization – iTOL v. 7.2.

Таблица 2. Штаммы *S. aureus* – этиологические агенты ПТИ, идентифицированные при расследовании 23 подтвержденных вспышек по данным расследований референс-центра по мониторингу за стафилококковыми инфекциями в системе Роспотребнадзора
 Table 2. Strains of *S. aureus*, etiologic agents of IPV, identified during the investigation of 23 confirmed outbreaks according to the investigation data of the reference center for monitoring staphylococcal infections in the Rospotrebnadzor system

Штаммы / Strains	Регион / год / Region / Year	CC/ST	Генотип / Genotype
2015_Yak_12434	Саха (Якутия) / 2015 / Sakha (Yakutia)	1/1	sea, seb, seh
2015_Yak_12457	Саха (Якутия) / 2015 / Sakha (Yakutia)	1/1	seb, seh
2018_Yak_SE61	Саха (Якутия) / 2018 / Sakha (Yakutia)	1/1	sea, seb, seh
2023_Tul_MR18	Тульская обл. / 2023 / Tula region	1/1	sea, seb, seh
2024_Kh-M_JU764	Ханты-Мансийск / 2024 / Khanty-Mansiysk	1/1	sea, seh, selk, selq
2023_Kur_SE100	Курская обл. / 2023 / Kursk region	1/1	sea, selq
2023_Kur_SE61	Курская обл. / 2023 / Kursk region	1/1	sea, seh, selq
2014_Abk_3	Хакасия / 2014 / Khakassia	5/5	sea, sed, selk, selq, tst
2023_Vol_SE207	Вологодская обл. / 2023 / Vologda region	5/5	sea, tst
2023_Brk_MR179	Брянская обл. / 2023 / Bryansk region	5/новый	sea
2023_Kir_DE126	Кировская обл. / 2023 / Kirov region	5/6	sea
2023_Kir_NO1228	Кировская обл. / 2023 / Kirov region	5/новый	sea
2023_Pkam_DE108	Камчатская обл. / 2023 / Kamchatka region	5/6	sea, sell, tst
2022_Krs_JU154	Красноярский край / 2022 / Krasnoyarsk region	5/3860	sec, sell
2019_Irk_DE237	Иркутская обл. / 2019 / Irkutsk region	8/5727	sea, sed
2022_Kem_DE35	Кемеровская обл. / 2022 / Kemerovo region	8/5727	sea, sed
2023_Krs_MR152	Красноярский край / 2023 / Krasnoyarsk region	8/5727	sea, sed
2024_Irk_FE176	Иркутская обл. / 2024 / Irkutsk region	8/5727	sea
2022_Krs_JU149	Красноярский край / 2022 / Krasnoyarsk region	8/3298	sea, sed, selk, selq, tst
2023_Krs_MR150	Красноярский край / 2023 / Krasnoyarsk region	8/новый	sea, selk, selq
2014_Sar_1752	Мордовия / 2014 / Mordovia	12/12	sea, seb
2023_Pkam_DE106	Камчатская обл. / 2023 / Kamchatka region	22/22	sea
2013_Spb_600	Ленинградская обл. / 2013 / Leningrad region	30/30	sea, tst
2014_Tvr_33	Тверская обл. / 2014	30/30	sea, tst
2023_Vol_SE208	Вологодская обл. / 2023 / Vologda region	30/30	sea, tst
2023_Yak_JU82	Саха (Якутия) / 2023 / Sakha (Yakutia)	30/30	sea, tst
2024_Yak_OC412	Саха (Якутия) / 2024 / Sakha (Yakutia)	30/30	sea
2024_YOI_JL141	Марий Эл / 2024 / Mari El	30/30	sea
2020_Irk_JN16	Иркутская обл. / 2020 / Irkutsk region	45/1665	sec, sell
2023_Kir_DE136	Кировская обл. / 2023 / Kirov region	45/45	sec, sell
2023_Kir_DE129	Кировская обл. / 2023 / Kirov region	45/45	sea, selk, selq
2024_Yak_OC418	Саха (Якутия) / 2024 / Sakha (Yakutia)	59/59	seb, selk, selq

вспышек в очаге инфекции были выявлены одновременно штаммы *S. aureus*, принадлежащие к различным клональным группам.

Первостепенное значение приобретает мониторинг предприятий общественного питания для своевременного выявления опасных эпидемических штаммов *S. aureus* и последующей санации. Выявление доминирующих клональных линий *S. aureus*, ассоциированных с ПТИ, позволяет разработать экспресс-тест-системы для обнаружения таких клональных линий при обследовании предприятий общественного питания.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the Sectoral Scientific Program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):603-61. DOI: 10.1128/CMR.00134-14
2. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int. 2014;2014:827965. DOI: 10.1155/2014/827965
3. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar 31;2(1):63-76.
4. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011 Jan;17(1):7-15. DOI: 10.3201/eid1701.p11101
5. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* – United States, 1998–2008. Clin Infect Dis. 2013 Aug;57(3):425-33. DOI: 10.1093/cid/cit244
6. Thielman NM, Guerrant RL. Clinical practice. Acute infectious diarrhea. N Engl J Med. 2004 Jan 1;350(1):38-47. DOI: 10.1056/NEJMcp031534
7. Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. Chem Immunol. 1992;55:1-35.
8. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr Med Chem. 2009;16(30):4003-19. DOI: 10.2174/092986709789352321
9. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2000 Mar;38(3):1008-15. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000
10. Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, Huang YC, et al. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 16;105(37):14130-5. DOI: 10.1073/pnas.0804178105
11. Гостев ВВ. Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам: специальность 1.5.11 «Микробиология»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Санкт-Петербург, 2024;333.
12. Argudín MA, Mendoza MC, González-Hevia MA, Bances M, Guerra B, Rodicio MR. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. Appl Environ Microbiol. 2012 Apr;78(8):2930-5. DOI: 10.1128/AEM.07487-11
13. Sato'o Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, et al. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. J Clin Microbiol. 2014 Jul;52(7):2637-40. DOI: 10.1128/JCM.00661-14
14. Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, Tu SI, et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. PLoS One. 2011;6(12):e28276. DOI: 10.1371/journal.pone.0028276
15. Онищенко ГГ, Абаев ИВ, Дятлов ИА, Скрыбин ЮП, Коробова ОВ, Соловьев ПВ, и др. Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Staphylococcus aureus* – возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г. Вестник РАМН. 2014;69(9-10):33-38.
16. Абаев ИВ, Скрыбин ЮП, Кисличкина АА, Коробова ОВ, Мицевич ИП, Мухина ТН, и др. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 – возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации. Вестник РАМН. 2017;72(5):346-354.
17. Abaev I, Skryabin Y, Kislichkina A, Bogun A, Korobova O, Dyatlov I. Draft Genome Sequences of Eight *Staphylococcus aureus* Strains Isolated during Foodborne Outbreaks. Genome Announc. 2018 Feb 1;6(5):e01557-17. DOI: 10.1128/genomeA.01557-17
18. Rehman S. A parallel and silent emerging pandemic: Antimicrobial resistance (AMR) amid COVID-19 pandemic. J Infect Public Health. 2023 Apr;16(4):611-617. DOI: 10.1016/j.jiph.2023.02.021
19. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol. 2017 Jun 8;13(6):e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595
20. Seemann T. mlst Github. Available at: <https://github.com/tseemann/mlst>
21. Seemann T. Abricate, Github. Available at: <https://github.com/tseemann/abricate>
22. Seemann T. snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy>
23. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 2020 May 1;37(5):1530-1534. DOI: 10.1093/molbev/msaa015
24. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. Nucleic Acids Res. 2024 Jul 5;52(W1):W78-W82. DOI: 10.1093/nar/gkae268
25. Bartels MD, Worning P, Andersen LP, Bes M, Enger H, Ås CG, et al. Repeated introduction and spread of the MRSA clone t304/ST6 in northern Europe. Clin Microbiol Infect. 2021 Feb;27(2):284.e1-284.e5. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.004
26. Гостев ВВ, Сидоренко СВ. Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России. Фарматека. 2015;299(6):30-38.

References

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):603-61. DOI: 10.1128/CMR.00134-14
2. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int. 2014;2014:827965. DOI: 10.1155/2014/827965
3. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar 31;2(1):63-76.
4. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011 Jan;17(1):7-15. DOI: 10.3201/eid1701.p11101
5. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* – United States, 1998–2008. Clin Infect Dis. 2013 Aug;57(3):425-33. DOI: 10.1093/cid/cit244
6. Thielman NM, Guerrant RL. Clinical practice. Acute infectious diarrhea. N Engl J Med. 2004 Jan 1;350(1):38-47. DOI: 10.1056/NEJMcp031534
7. Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. Chem Immunol. 1992;55:1-35.
8. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr Med Chem. 2009;16(30):4003-19. DOI: 10.2174/092986709789352321
9. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2000 Mar;38(3):1008-15. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000
10. Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, Huang YC, et al. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 16;105(37):14130-5. DOI: 10.1073/pnas.0804178105
11. Gostev VV. Population structure of *Staphylococcus aureus* and trajectories of antimicrobial resistance evolution: speciality 1.5.11 «Microbiology»: dissertation

- for the degree of Doctor of Biological Sciences. Saint Petersburg, 2024;333. (In Russian).
12. Argudín MA, Mendoza MC, González-Hervía MA, Bances M, Guerra B, Rodicio MR. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Apr;78(8):2930-5. DOI: 10.1128/AEM.07487-11
 13. Sato'o Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, et al. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *J Clin Microbiol*. 2014 Jul;52(7):2637-40. DOI: 10.1128/JCM.00661-14
 14. Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, Tu SI, et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLoS One*. 2011;6(12):e28276. DOI: 10.1371/journal.pone.0028276
 15. Onishchenko GG, Abaev IV, Dyatlov IA, Skryabin YP, Korobova OV, Solovoyov PV, et al. Molecular Genetic Identification of *Staphylococcus aureus* Strain, Caused a Foodborne Illness Outbreak in St. Petersburg in 2013. *Annals of the Russian Academy of Medical Science*. 2014;69(9-10):33-38. (In Russian).
 16. Abaev IV, Skryabin YP, Kislichkina AA, Korobova OV, Mitsevich IP, Mukhina TN, et al. Genomic Analysis of Food-Borne *Staphylococcus aureus* CC30 Strains in the Russian Federation. *Annals of the Russian Academy of Medical Science*. 2017;72(5):346-354. (In Russian).
 17. Abaev I, Skryabin Y, Kislichkina A, Bogun A, Korobova O, Dyatlov I. Draft Genome Sequences of Eight *Staphylococcus aureus* Strains Isolated during Foodborne Outbreaks. *Genome Announc*. 2018 Feb 1;6(5):e01557-17. DOI: 10.1128/genomeA.01557-17
 18. Rehman S. A parallel and silent emerging pandemic: Antimicrobial resistance (AMR) amid COVID-19 pandemic. *J Infect Public Health*. 2023 Apr;16(4):611-617. DOI: 10.1016/j.jiph.2023.02.021
 19. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*. 2017 Jun 8;13(6):e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595
 20. Seemann T. mlst Github. Available at: <https://github.com/tseemann/mlst>
 21. Seemann T. Abricate, Github. Available at: <https://github.com/tseemann/abricate>
 22. Seemann T. snippy: fast bacterial variant calling from NGS readS. 2015. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy>
 23. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol*. 2020 May 1;37(5):1530-1534. DOI: 10.1093/molbev/msaa015
 24. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res*. 2024 Jul 5;52(W1):W78-W82. DOI: 10.1093/nar/gkae268
 25. Bartels MD, Worning P, Andersen LP, Bes M, Enger H, Ås CG, et al. Repeated introduction and spread of the MRSA clone t304/ST6 in northern Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Feb;27(2):284.e1-284.e5. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.004
 26. Gostev VV, Sidorenko SB. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the problem of expansion in the world and in Russia. *Farmateka*. 2015;299(6):30-38. (In Russian).

Информация о соавторах:

Скрябин Юрий Павлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Лощинин Дмитрий Михайлович, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Фурсова Анастасия Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Люлина Елизавета Эдуардовна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии 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

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Yury P. Skryabin, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Dmitry M. Loschinin, Junior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Anastasia D. Fursova, Junior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Irina P. Mitsevich, Senior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elizaveta E. Lyulina, Junior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anzhelika A. Sizova, Junior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatiana N. Mukhina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Морфобиохимические и пробиотические исследования дрожжевого изолята рода *Metschnikowia* spp.

А.Ю.Солина, О.А.Артемьева

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К.Эрнста»,
г.о. Подольск, Российская Федерация

Выделение и изучение микроорганизмов, обладающих пробиотической активностью, является актуальным направлением исследования в отрасли животноводства. При использовании дрожжеподобных грибов в качестве пробиотических агентов можно разрешить сразу несколько вопросов: дрожжевые клетки являются источником заменимых и незаменимых аминокислот, ассимилируют избыточное содержание кислорода, снижают риск возникновения ацидоза, стимулируют рост целлюлозолитических бактерий и стабилизируют pH среды.

Авторами выделен дрожжевой изолят из содержимого желудочно-кишечного тракта коров, по морфобиохимическим показателям идентифицированный как представитель рода *Metschnikowia*. Исследования на потенциально пробиотические свойства показали, что изолят не обладает токсичностью, у него отсутствуют факторы патогенности и устойчивость к антимикотическим препаратам, наблюдается способность к активному росту при различных pH и высоком осмотическом давлении. Данные свойства являются пробиотико-позитивными реакциями. Исследования вновь выделенных дрожжеподобных грибов на потенциально позитивные свойства позволяет дополнить группу классически используемых пробиотических микроорганизмов (*Bifidobacteria*, *Lactobacillus*).

Ключевые слова: выделение микроорганизмов, дрожжи, морфобиохимические, пробиотические свойства, *Metschnikowia* spp.

Для цитирования: Солина А.Ю., Артемьева О.А. Морфобиохимические и пробиотические исследования дрожжевого изолята рода *Metschnikowia* spp. Бактериология. 2025; 10(2): 87–92. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-87-92

Morphobiochemical and probiotic studies of a yeast isolate of the genus *Metschnikowia* spp.

A.Yu.Solina, O.A.Artemyeva

Academician L.K.Ernst Federal Research Center for Husbandry, Podolsk, Russian Federation

Isolation and study of microorganisms with probiotic activity is an important area of research in the livestock industry. When using yeast-like fungi as probiotic agents, several issues can be addressed simultaneously. Yeast cells are a protein structure containing a range of essential and non-essential amino acids. They assimilate excess oxygen, reduce the risk of acidosis, stimulate cellulolytic bacteria, and stabilize the pH of the medium. Studying newly isolated yeast-like fungi for potentially positive properties allows us to supplement the group of classically used (*Bifidobacteria*, *Lactobacillus*) probiotic microorganisms.

The research aimed to obtain new knowledge about the morphobiochemical and probiotic properties of a yeast isolate from a natural biotope. We identified the yeast isolate from the gastrointestinal tract contents of cows as belonging to the genus *Metschnikowia* spp. based on morphobiochemical parameters. This isolate exhibited resistance to antimycotic drugs and the ability to actively grow at various pH levels and high osmotic pressure, characteristics indicative of probiotic-positive reactions.

Key words: highlighting probability, yeast, morphological, biochemical, probiotic properties, *Metschnikowia* spp.

For citation: Solina A.Yu., Artemyeva O.A. Morphobiochemical and probiotic studies of a yeast isolate of the genus *Metschnikowia* spp. Bacteriology. 2025; 10(2): 87–92. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-87-92

Для корреспонденции:

Солина Алина Юрьевна, аспирант лаборатории микробиологии
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ им. акад. Л.К.Эрнста»

Адрес: 142132, Московская область, г. Подольск, пос. Дубровицы, 60
Телефон: (496) 765-1163

Статья поступила 02.12.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Alina Yu. Solina, post-graduate student of the laboratory of microbiology,
Academician L.K.Ernst Federal Research Center for Husbandry

Address: 60 Dubrovitsy settlement, Podolsk, Moscow region, 142132,
Russian Federation
Phone: (496) 765-1163

The article was received 02.12.2024, accepted for publication 30.06.2025

По данным Всемирной организации здравоохранения, пробиотики – это живые микроорганизмы, при адекватном введении доз которых на организм хозяина оказывается позитивное воздействие.

Пробиотические микроорганизмы способны расти и размножаться при температуре, соответствующей температуре тела хозяина. Пробиотики способны сохранять жизнеспособность при неблагоприятных условиях среды, таких как низкий pH, наличие пищеварительных ферментов и панкреатического сока, соответствующих условиям в кишечном тракте млекопитающих [1].

Идея использования микроорганизмов в качестве стимулятора оздоровления макроорганизма возникла давно. И.И.Мечников в 1907 г. выдвинул предположение, что микроорганизмы, применяемые *per or*, могут оказывать позитивное воздействие на аборигенную микрофлору кишечного тракта хозяина. В 1908 г. им же был введен термин, состоящий из двух слов греческого происхождения – «про» и «биос», что в переводе означает «на всю жизнь». В дальнейшем ученые эксперты начали использование внедрения консорционных групп микроорганизмов, обосновывая выбор данной стратегии тем, что различные штаммы, вероятно, имеют различные мишени воздействия и оказывают симбиотическое действие друг на друга. В исследования консорционного взаимодействия микроорганизмов входили не только группы бактериальных клеток разных родов, но и дрожжеподобные грибы, такие как *Saccharomyces* spp. [2–4].

Наряду с использованием для непосредственных потребностей человека, дрожжи также широко применяются в животноводстве. Дрожжевые грибы являются перспективным источником белка, который превосходит белок растительного происхождения и приравнивается к животному. Также в их составе присутствует широкий спектр заменимых и незаменимых аминокислот и до 6% нуклеиновых кислот [5–7].

В результате многочисленных исследований было установлено, что дрожжи оказывают стимулирующее воздействие на лактобактерии, вырабатывающие молочную кислоту, улучшают ростовые свойства целлюлозолитических бактерий, а также стабилизируют кислотность среды, тем самым снижая риск возникновения ацидоза, ассимилируют избыточное содержание кислорода в рубце [8, 9].

Применение пробиотических культур в птицеводстве также дает позитивные результаты. Улучшается переваривающая активность в отношении белков и липидов, повышается выработка расщепляющих углеводы ферментов, также наблюдается повышение активности потенциально полезной флоры кишечного тракта и увеличение сопротивляемости тепловому стрессу. На фоне всех перечисленных факторов наблюдается общее повышение продуктивности исследованных птиц [9].

Помимо всего перечисленного, дрожжи являются источником витаминов D, E, F, K, группы B, а также важных микроэлементов, находящихся в биоусвояемой форме [10].

Исследования Montazar Al-Nijir, Daniel A. Henk и др. показали, что определенные штаммы *Metschnikowia pulcherrima* могут подавлять рост проблемных организмов, таких как патогенная кишечная палочка птиц, сальмонелла и стафилококк [11].

Эффекты подавления не были пассивными, а вместо этого были частью особого ответа на присутствие этих микробов посредством выработки определенных белков. Было показано, что *M. pulcherrima* метаболизирует широкий спектр сахаров и культивируется в минимально контролируемой среде и нестерильных условиях, а также является идеальным организмом для биотехнологических процессов.

Ученые провели исследование пробиотического потенциала штаммов *M. pulcherrima* на предмет их пригодности в условиях содержания птицы. Данные исследования указывают на то, что ранее обнаруженные противомикробные штаммы *M. pulcherrima* демонстрируют многообещающее пробиотическое поведение, включая образование биопленки, автоагрегацию, гидрофобность клеточной поверхности, адгезию к клеткам Caco-2, антиоксидантную способность и устойчивость к желудочным стрессам [11, 12].

В связи с опубликованными позитивными исследованиями других ученых было принято решение исследовать возможный пробиотический потенциал выделенного в условиях микробиологической лаборатории ФГБНУ «ФИЦ ВИЖ им. Л.К.Эрнста» штамма дрожжевого микроорганизма, идентифицированного как *Metschnikowia* spp.

Целью работы являлось получение новых знаний о морфобioхимических и пробиотических свойствах дрожжевого изолята рода *Metschnikowia* spp., выделенного из природного биотопа.

Материалы и методы

В условиях лаборатории микробиологии ФГБНУ «ФИЦ ВИЖ им. Л.К.Эрнста» из содержимого желудочно-кишечного тракта коров был выделен штамм дрожжевой культуры. Посев проводился на селективную агаризованную среду Сабуро в объеме 0,2 мл инокулята на чашку Петри поверхностным методом. Термостатирование продолжалось 72 ч при 30°C.

Во избежание возможного обсеменения изучаемого штамма симбиотно-развивающимися культурами методом истощающего штриха проводилась очистка дрожжевого изолята с использованием составной агаризованной среды ДАП (Диадексин А-агар): 2,0 г пептона; 2,0 г дрожжевого экстракта; 30,0 г агар-агара; 20,0 г глюкозы на 1 л среды.

Выделенный штамм дрожжеподобных грибов был охарактеризован фенотипически стандартными методами согласно ранее описанным методикам [13].

Токсикологический статус изолята устанавливался путем использования коммерческой тест-культур инфузорий *Tetrachymena pyriformis* [14].

Возможность изолята ассимилировать различные субстраты исследовалась на планшетах фирмы HiMedia согласно производственной инструкции [15].

Сбраживающие свойства изолята дрожжей исследовались на синтетических средах Гисса с глюкозой, мальтозой, маннитом и сахарозой. Посев проводился посредством укола. Выращивание продолжалось в течение 48 ч при 30°C.

Способность к спорообразованию изолята определялась стандартными методами [13].

Пробиотическая активность выделенного изолята определялась в соответствии с «ОФС.1.7.2.0012.15 Производст-



Рис. 1. Макроскопическое изображение колоний исследуемого изолята, культивирование 48 ч, $t = 28^{\circ}\text{C}$: на среде Сабуро (слева); на составной агаризованной среде ДАП (справа).

Fig. 1. Macroscopic image of colonies of the studied isolate, cultivation for 48 hours, $t = 28^{\circ}\text{C}$: on Sabo medium (left); on compound agar DAP medium (right).

венные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» [16].

Исследование протеинового и аминокислотного состава культуры дрожжей проводилось в Лаборатории химико-аналитических исследований в животноводстве ФГБНУ «ФИЦ ВИЖ им. Л.К.Эрнста» по общепринятой методике.

Результаты исследования и их обсуждения

Колонии дрожжевого изолята на агаризованных средах имели круглую форму. Размер колоний $2 \pm 0,2$ мм в диаметре, края ровные, профиль бугристый, поверхность гладкая однородной структуры.

В результате 48-часового культивирования на составной агаризованной среде ДАП при 28°C колонии приобретали матовое кремовое окрашивание, на среде Сабуро при аналогичных условиях культивирования колонии изолята имеют глянцевое черное окрашивание. Рост колоний на чашке Петри густой (рис. 1).

Клетки изолята дрожжей имеют грушевидную форму с расширением к основанию. Размер $3,4 \times 2,0$ мкм, грамм-негативные, образование мицелиальных структур обуславливается ложным мицелием как в аэробных, так и в анаэробных условиях, половые процессы представлены делением, по

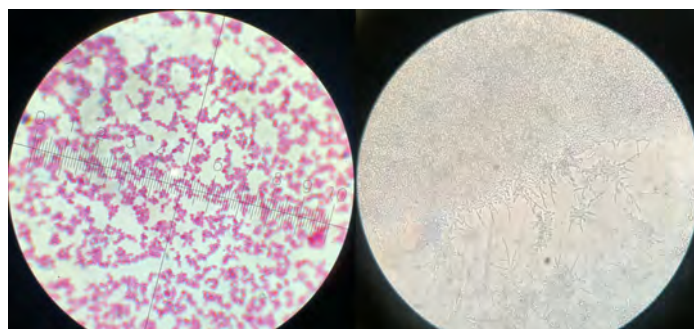


Рис. 2. Микроскопическое изображение изолята (увеличение 16×90): слева – окраска по Граму; справа – образование мицеллярных структур.

Fig. 2. Microscopic image of the isolate (magnification 16×90): left – Gram staining; right – formation of micellar structures.

отношению к кислороду является факультативным анаэробом (рис. 2).

Был также исследован спектр веществ на возможность их ассимиляции изолятом дрожжевой культуры (табл. 1). Данные ассимиляционных процессов способствуют родовой идентификации штамма, указывают на пробиотический потенциал, а также учитываются при подборе ростовых сред.

Из 39 исследованных веществ, указанных в табл. 1, дрожжевой изолят проявил активность к 11 – глюкозе, фруктозе, декстрозе, сахарозе, лактозе, галактозе, L-арабинозе, манниту, маннозе, инулину и мелецитозе.

По морфобиохимическим свойствам выделенный дрожжевой штамм был классифицирован как представитель рода *Metschnikowia* spp.

Клетки дрожжеподобных грибов рода *Metschnikowia* обычно от круглой до грушевидной формы. Псевдомицелий отсутствует либо рудиментирован. Аски булавовидные или клиновидные, аскоспоры заостренные с одного или двух концов, форма игловидная [17].

Из табл. 2 видно, что исследуемый изолят дрожжей содержит относительно высокое количество заменимых аминокислот, таких как аспаргиновая кислота ($0,48$ г/100 г сухого вещества), которая играет важную роль в обмене азотистых веществ, и глутамат ($0,61$ г/100 г), обладающий

Таблица 1. Ассимиляционная активность изолята дрожжей

Table 1. Assimilation activity of yeast isolate

Глюкоза / Glucose	+	Глицерол / Glycerol	–	Утилизация цитрата / Citrate disposal	–
Фруктоза / Fructose	+	Салицин / Salicin	–	Утилизация малоната / Disposal of malonate	–
Декстроза / Dextrose	+	Адонит / Adonite	–	Сорбоза / Sorbose	–
Мелибиоза / Melibiosis	–	Арабитол / Arabitol	–	ОНФГ / ONFG	–
Сахароза / Sucrose	+	Эритрит / Erythritol	–	Гидролиз эскулина / Hydrolysis of esculin	–
Лактоза / Lactose	+	Дульцит / Dulcitate	–	D-Арабиноз / D-Arabinose	–
Ксилоза / Xylose	–	Инозит / Inositol	–	Целлобиоза / Cellobiose	–
Мальтоза / Maltose	–	Сорбит / Sorbitol	–	Мелецитоза / Melecytosis	+
Галактоза / Galactose	+	Маннит / Sorbitol	+	α -метил-D-маннозид / α -methyl-D-mannoside	–
Раффиноза / Raffinose	–	Манноза / Mannose	+	Ксилитол / Xylitol	–
Трегалоза / Trehalose	–	Инулин / Inulin	+	α -метил-D-глюкозид / α -methyl-D-glucoside	–
L-Арабиноза / L-Arabinose	+	Натрия глюконат / Sodium gluconate	–	Рамноза / Ramnoza	–

«+» – ассимиляция вещества происходит; «–» – ассимиляция вещества не происходит /
 “+” – assimilation of the substance occurs; “–” – assimilation of the substance does not occur

Таблица 2. Аминокислотный состав изолятов дрожжевых культур
Table 2. Amino acid composition of isolates of yeast cultures (Amino acid content, g/100 g dry matter)

Аминокислота / Amino acid	Содержание в изоляте* / Content in isolate	Аминокислота / Amino acid	Содержание в изоляте* / Content in isolate	Аминокислота / Amino acid	Содержание в изоляте* / Content in isolate
ASP	0,48	VAL	0,21	HIS	0,18
THR	0,25	MET	0,19	LYS	0,31
SER	0,25	ILE	0,18	ARG	0,18
GLU	0,61	LEU	0,29	PRO	0,15
GLY	0,26	TYR	0,14	Cys*	0,05
ALA	0,25	PHE	0,15	–	–

* Содержание аминокислот, г/100 г сухого вещества. ASP – аспарагиновая кислота; THR – треонин; SER – серин; GLU – глутамат; GLY – глицин; ALA – аланин; VAL – валин; MET – метионин; ILE – изолейцин; LEU – лейцин; TYR – тирозин; PHE – фенилаланин; HIS – гистидин; LYS – лейцин; ARG – аргинин; PRO – пролин; Cys – цистеин.

* Amino acid content, g/100 g dry matter. ASP – aspartic acid; THR – threonine; SER – serine; GLU – glutamate; GLY – glycine; ALA – alanine; VAL – valine; MET – methionine; ILE – isoleucine; LEU – leucine; TYR – tyrosine; PHE – phenylalanine; HIS – histidine; LYS – leucine; ARG – arginine; PRO – proline; Cys – cysteine.

нейромедиативными свойствами. Кроме того, в изоляте имеются незаменимые аминокислоты, такие как лейцин (0,31 г/100 г), который связан с оптимизацией состояния щитовидной железы и метаболическими реакциями мышечной ткани.

Содержание сырого протеина составляет 20,18% на 100 г сухого вещества на голодной среде.

Изолят не проявляет токсикологической опасности на тест-культуре инфузорий *Tetrachymena pyriformis*, по истечении времени исследования инфузории остаются активными,

форма клеток и характер направления движения не изменены.

Для подтверждения пробиотических функций микроорганизма необходимо было выполнить ряд исследований *in vitro*, которые показывают потенциально позитивное воздействие на организм *in vivo*.

Реакции контроля проводились с использованием тест-культур в соответствии с «ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» [18].

Исследования были проведены при 38°C, так как данная температура близка к температуре тела.

Приведенные в табл. 3 данные соответствуют характеристике штамма с пробиотическим потенциалом. [14].

Помимо сравнимых с контролем реакций, позитивные пробиотические свойства отображаются показателями, представленными в табл. 4. Исследуемый дрожжевой изолят способен к росту как при низких, так и при высоких показателях pH. Данное условие необходимо для пробиотической культуры, так как после ее употребления животным микроорганизмы сталкиваются с кислой средой желудка и щелочной – кишечника.

Антимикотическая активность также является важным показателем при исследованиях потенциально-пробиотических культур. Нами было исследовано 5 различных антимикотических соединений, и изолят *Metschnikowia* spp. проявил задержку роста в каждом случае. Как видно из табл. 4, *Metschnikowia* spp. оказался наиболее чувствителен к кетоконазолу (20 мкг). Из четырех исследованных сахаров сбраживающая активность была обнаружена к глюкозе.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о потенциально положительном пробиотическом потенциале исследуемого штамма *Metschnikowia* spp.

Таблица 3. Пробиотические свойства изолята *Metschnikowia* spp. в сравнении с контролем
Table 3. Probiotic properties of *Metschnikowia* spp. isolate compared to control

Наименование исследования / Name of the study	Контроль положительный/отрицательный / Control Positive/Negative	<i>Metschnikowia</i> spp.
Плазмолитическая активность / Plasmolytic activity	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P / <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	–
Гемолитическая активность / Hemolytic activity	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P / <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	–
Сбраживающая способность / Fermentation ability	–	–
Желатинразжижающая активность / Gelatin liquefying activity	<i>Proteus mirabilis</i> 3177 / <i>Yersinia enterocolitica</i> № 134	–
Продукция лецитиназы / Lecithinase production	<i>S. aureus</i> 6538-P ATCC / <i>S. epidermidis</i> 14990 ATCC	–
Способность роста при высоком осмотическом давлении, 6,5% NaCl 28°C / Growth ability at high osmotic pressure, 6.5% NaCl 28°C	+	+
Продукция каталазы / Catalase products	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P / <i>E. faecalis</i> CCM 4224	–
Фибринолитические свойства / Fibrinolytic properties	<i>S. pyogenes</i> / <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	+
Продукция амилазы / Amylase production	–	–
Реакция Фогеса-Проскауэра / Voges-Pro skauer test	<i>Enterobacter aerogenes</i> / <i>Escherichia coli</i>	–
Утилизация цитрата / Citrate disposal	<i>P. mirabilis</i> 3177 / <i>Y. enterocolitica</i> № 134	–
Определение наличия фагов / Def. presence of phages	–	–
Образование аммиака / Ammonia formation	–	–
Образование индола / Indole formation	–	–

«+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция / «+» – positive reaction; «-» – negative reaction

Таблица 4. Пробиотические свойства *Metschnikowia* spp., 24–48 чTable 4. Probiotic properties of *Metschnikowia* spp., 24–48 h

Наименование исследования / Name of the study	Показатель / Index	<i>Metschnikowia</i> spp.
Способность роста при различных рН среды / Growth ability at different pH environments	2,48	+
	3,51	+
	8,05	+
	9,33	+
	9,92	+
	10,26	+
	10,71	+
Антимикотическая активность, мм 28°С / Antimycotic activity, mm 28°С	Флуконазол 30 мкг / Fluconazole 30 mcg	16,4
	Итраконазол 10 мкг / Itraconazole 10 mcg	12,5
	Нистатин 80 мкг / Nystatin 80 mcg	31,1
	Клотримазол 10 мкг / Clotrimazole 10 mcg	22,4
	Кетоконазол 20 мкг / Ketoconazole 20 mcg	35,0
Сбраживание сахаров / Fermentation of sugars	Сахароза / Sucrose	–
	Лактоза / Lactose	–
	Глюкоза / Glucose	+
	Маннит / Mannitol	–

«+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция /
“+” – positive reaction; “-” – negative reaction

В дальнейшей исследовательской работе планируется расширить спектр изучаемых свойств и провести исследования по установлению антагонистической активности изолята в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Для получения более обширной информации также необходимо проведение молекулярно-генетических исследований и исследований *in vivo*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований Минобрнауки РФ №124020200032-4 (FGGN-2024-0016).

Financial support

The work was carried out within the framework of a state assignment with financial support from fundamental scientific research of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No 124020200032-4 (FGGN-2024-0016).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and

Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Aug;11(8):506-14. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66

- Петунина ИА, Ломидзе МА. Статистика общих болезней человека и животных. Итоги и перспективы развития агропромышленного комплекса. 2020; 726-729. DOI: 10.26150/PAFNC.2019.45.557-21-726-729
- Ломидзе МА, Хорошайло ТА. Актуальность использования пробиотиков в животноводстве. Здоровьесберегающие технологии, качество и безопасность пищевой продукции: сб. ст. по материалам Всерос. конф. с междунар. участием. Краснодар: КубГАУ. 2021;321-325.
- Рябцева СЛ, Сазонова СМ, Дубинина АЛ. Дрожжи как пробиотики: механизмы действия и возможности применения. Переработка молока. 2019;6:32-34. DOI: 10.33465/2222-5455-2019-6-32-34
- Банницына ТЕ, Канарский АВ, Щербаков АВ, Чеботарь ВК, Кипрушкина ЕИ. Дрожжи в современной биотехнологии. Вестник Международной академии холода. 2016;1:24-29. DOI: 10.21047/1606-4313-2016-16-1-24-29
- Kavšček M, Stražar M, Curk T, Natter K, Petrovič U. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. Microb Cell Fact. 2015 Jun 30;14:94. DOI: 10.1186/s12934-015-0281-x
- Джиоева ЗГ. Влияние на рост и развитие бройлеров кормовых дрожжей в составе их рациона. Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета, Владикавказ, 12 марта 2021 г. Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2021;139-141.
- Гуляева МЕ, Смирнова ЛВ. Кормовые дрожжи в питании молочных коров. Молочнохозяйственный вестник. 2011;2:11-13.
- Дускаев ГК, Левахин ГИ, Королёв ВЛ, Сиразетдинов ФХ. Использование пробиотиков и растительных экстрактов для улучшения продуктивности жвачных животных (обзор). Животноводство и кормопроизводство. 2019;1:136-148. DOI: 10.33284/2658-3135-102-1-136
- Злочевский ЛА, Павлов ИН, Павлова НВ. Тепловая обработка и удаление горьких веществ остаточных пивных дрожжей. Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, Бийск, 18–20 мая 2022 г. Бийск: Алтайский государственный технический университет им. И.И.Ползунова, 2022;415-418.
- Al-Nijir M, Henk DA, Bedford MR, Chuck CJ. Assessing *Metschnikowia pulcherrima* as a Potential Probiotic Yeast for Animal Feed. Sustain. Microbiol. 2024;1:qvae008. DOI: 10.1093/sumbio/qvae008
- Hicks RH, Moreno-Beltrán M, Gore-Lloyd D, Chuck CJ, Henk DA. The Oleaginous Yeast *Metschnikowia pulcherrima* Displays Killer Activity against Avian-Derived Pathogenic Bacteria. Biology (Basel). 2021 Nov 24;10(12):1227. DOI: 10.3390/biology10121227
- Бабьева ИП, Голубев ВИ. Методы выделения и идентификации дрожжей. М.: Пищевая промышленность, 1979.
- МУ 13-7-2/2156. Методические указания по ускоренному определению токсичности продуктов животноводства и кормов; ГОСТ 31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.
- HiBio-ID Инструкция по применению – Наборы для идентификации микроорганизмов, HiMedia Laboratories.
- Фармакопоя.рф [Электронный ресурс]. Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov/>
- Савчик АВ, Кантерова АВ, Леонович СИ, Ладутько ЕИ, Новик ГИ. Молекулярно-генетическая идентификация дрожжевых грибов из фонда белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Пищевая промышленность: наука и технологии. 2020;13(3):61-69.

18. ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков – Фармакопоя.рф [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov/> (дата обращения: 30.11.2024).

References

1. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66
2. Petunina IA, Lomidze MA. Statistics of common human and animal diseases. Results and prospects for the development of the agro-industrial complex. 2020; 726-729. DOI: 10.26150/PAFNC.2019.45.557-21-726-729 (In Russian).
3. Lomidze MA, Khoroshailo TA. The relevance of the use of probiotics in animal husbandry. Health-saving technologies, quality and safety of food products: Sat. Art. based on the materials of the All-Russian conf. with international participation. Krasnodar: KubGAU. 2021;321-325. (In Russian).
4. Ryabtseva SL, Sazonova SM, Dubinina AL. Yeast as probiotics: mechanisms of action and possibilities of application. *Milk processing*. 2019;6:32-34. DOI: 10.33465/2222-5455-2019-6-32-34 (In Russian).
5. Bannizina TE, Kanarskii AV, Shcherbakov AV, Chebotar VK, Kiprushkina EI. Yeast in modern biotechnology. *Bulletin of the International Academy of Cold*. 2016;1:24-29. DOI: 10.21047/1606-4313-2016-16-1-24-29 (In Russian).
6. Kavšček M, Stražar M, Curk T, Natter K, Petrovič U. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. *Microb Cell Fact*. 2015 Jun 30;14:94. DOI: 10.1186/s12934-015-0281-x
7. Dzhioeva ZG. Influence on the growth and development of broilers fodder yeast as part of their diet. Scientific works of students of the Gorsky State Agrarian University, Vladikavkaz, March 12, 2021. Vladikavkaz: Gorsky State Agrarian University, 2021;139-141. (In Russian).
8. Gulyaeva ME, Smirnova LV. Feed yeast in the nutrition of dairy cows. *Dairy Bulletin*. 2011;2:11-13. (In Russian).
9. Duskaev GK, Levakhin GI, Korolev VL, Sirazetdinov FK. The use of probiotics and plant extracts to improve the productivity of ruminants (review). *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2019;1:136-148. DOI: 10.33284/2658-3135-102-1-136 (In Russian).
10. Zlochevsky LA, Pavlov IN, Pavlova NV. Heat treatment and removal of bitter substances of residual brewer's yeast. *Technologies and equipment of the chemical, biotechnological and food industry: Materials of the XV All-Russian scientific-practical conference of students, graduate students and young scientists with international participation*, Biysk, May 18–20, 2022. Biysk: I.I.Polzunov Altai State Technical University. 2022;415-418. (In Russian).
11. Al-Nijir M, Henk DA, Bedford MR, Chuck CJ. Assessing *Metschnikowia pulcherrima* as a Potential Probiotic Yeast for Animal Feed. *Sustain. Microbiol*. 2024;1:qvae008. DOI: 10.1093/sumbio/qvae008
12. Hicks RH, Moreno-Beltrán M, Gore-Lloyd D, Chuck CJ, Henk DA. The Oleaginous Yeast *Metschnikowia pulcherrima* Displays Killer Activity against Avian-Derived Pathogenic Bacteria. *Biology (Basel)*. 2021 Nov 24;10(12):1227. DOI: 10.3390/biology10121227
13. Bab'eva IP, Golubev VI. Methods for isolation and identification of yeast. M.: Food industry, 1979. (In Russian).
14. MU 13-7-2/2156. Metodicheskie ukazaniya po uskorenному opredeleniyu toksichnosti produktov zhivotnovodstva i kormov; GOST 31674-2012. Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredeleniya obshchei toksichnosti. (In Russian).
15. HiBio-ID Instructions for use – Kits for the identification of microorganisms, HiMedia Laboratories. (In Russian).
16. Pharmacopoeia.rf [Electronic resource]. Production probiotic strains and strains for the control of probiotics. Access mode: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov/> (In Russian).
17. Savchik AV, Kanterova AV, Leonovich SI, Ladutko EI, Novik GI. Molecular genetic identification of yeast from the fund of the belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. *Food Industry: Science and Technology*. 2020;13(3):61-69. (In Russian).
18. ОФС.1.7.2.0012.15 Production probiotic strains and strains for probiotic control – Pharmacopoeia.rf [Electronic resource]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov/> (date of access: 30.11.2024).

Информация о соавторе:

Артемьева Ольга Анатольевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К.Эрнста»

Information about co-author:

Olga A. Artemyeva, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Microbiology, Leading Researcher, Academician L.K.Ernst Federal Research Center for Husbandry

Характеристика литического бактериофага KpV17Skif – нового представителя рода *Drulisvirus*, активного против *Klebsiella pneumoniae* капсульного типа K23

Н.В.Колупаева¹, А.А.Сизова¹, Е.Б.Лазарева², Т.В.Черненькая², Н.Е.Сузина³, Н.В.Воложанцев¹

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

²ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Российская Федерация;

³Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Московская область, Российская Федерация

Возникновение и распространение антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* является важной проблемой общественного здравоохранения. Особую угрозу представляют гипервирулентные (hvkp) и мультирезистентные штаммы *K. pneumoniae*, вызывающие тяжелые внутрибольничные и внебольничные заболевания. Актуальным направлением в борьбе с инфекциями, вызванными данным патогеном, является поиск и характеристика литических бактериофагов. В ходе проведенного исследования выделен и охарактеризован новый бактериофаг KpV17Skif семейства *Autographiviridae* (род *Drulisvirus*), активный в отношении *K. pneumoniae* капсульного типа K23. Определена полная нуклеотидная последовательность генома бактериофага. На основании сходства ДНК и предполагаемых полипептидных продуктов с известными фагами определены функции продуктов 28 из 53 предсказанных генов. Установлено, что бактериофаг KpV17Skif имеет типичную организацию генома T7-подобных фагов с наличием собственных генов ДНК- и РНК-полимераз и кассеты лизиса, состоящей из генов спанина, холина и эндолизина. В геноме фага не обнаружены гены, ассоциированные с устойчивостью к антибактериальным агентам, а также гены, ответственные за лизогенный путь развития бактериофага. Предполагается, что выраженная K23-специфичность фага KpV17Skif связана с наличием гена, кодирующего рецептор-связывающий белок Skif45 с доменом полисахарид-деполимеризы.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, капсульный полисахарид, антибактериальная терапия, бактериофаг, деполимераза

Для цитирования: Колупаева Н.В., Сизова А.А., Лазарева Е.Б., Черненькая Т.В., Сузина Н.Е., Воложанцев Н.В. Характеристика литического бактериофага KpV17Skif – нового представителя рода *Drulisvirus*, активного против *Klebsiella pneumoniae* капсульного типа K23. Бактериология. 2025; 10(2): 93–102. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-93-102

Characteristics of the lytic bacteriophage KpV17Skif, a new member of the genus *Drulisvirus*, active against *Klebsiella pneumoniae* of the K23 capsular type

N.V.Kolupaeva¹, A.A.Sizova¹, E.B.Lazareva², T.V.Chernenkaya², N.E.Suzina³, N.V.Volozhantsev¹

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

²N.V.Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation;

³Research Center Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 28.05.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

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

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182

The article was received 20.05.2025, accepted for publication 30.06.2025

The emergence and spread of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains is an important public health problem. Hypervirulent (hvKp) and multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae* causing severe hospital-acquired and out-of-hospital illnesses are a particular threat. An actual direction in the fight against infections caused by this pathogen is the search and characterization of lytic phages. In this study, a new bacteriophage KpV17Skliif of the family *Autographiviridae* (genus *Drulivirus*), active against *K. pneumoniae* capsular type K23, was isolated and characterized. The complete nucleotide sequence of the bacteriophage genome has been determined. The functions of the products of 28 of 53 predicted genes were determined based on the similarity of DNA and putative polypeptide products with known phages. It was found that the KpV17Skliif bacteriophage has a typical T7-like phage genome organization with its own DNA and RNA polymerase genes and a lysis cassette consisting of spanin, holin, and endolysin genes. The phage genome does not contain genes associated with resistance to antibacterial agents, as well as genes responsible for the lysogenic pathway of bacteriophage development. It is assumed that the pronounced K23 specificity of the KpV17Skliif phage is associated with the presence of a gene encoding the predicted receptor-binding protein Skif45 with a polysaccharide depolymerase domain.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, capsular polysaccharide, antimicrobial therapy, bacteriophage, depolymerase

For citation: Kolupaeva N.V., Sizova A.A., Lazareva E.B., Chernenkaya T.V., Suzina N.E., Volozhantsev N.V. Characteristics of the lytic bacteriophage KpV17Skliif, a new member of the genus *Drulivirus*, active against *Klebsiella pneumoniae* of the K23 capsular type. Bacteriology. 2025; 10(2): 93–102. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-93-102

Устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам становится все более актуальной клинической проблемой во всем мире. *Klebsiella pneumoniae*, способная формировать устойчивость к представителям всех классов антибиотиков, на сегодняшний день является лидирующим оппортунистическим патогеном, способным вызывать широкий спектр внутрибольничных и внебольничных инфекций, таких как сепсис, пневмония, менингит, первичные абсцессы печени, инфекции мочевыводящих путей, ожоговых ран и хирургических швов [1–3].

Большая озабоченность клиницистов связана с появлением и все более широким распространением штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра действия (ESBL) и карбапенемазы (CP) [4, 5]. Для инфекций, вызванных ESBL- или CP-продуцирующими штаммами, характерны более высокие показатели тяжести заболевания и смертности [6]. Особенно это касается так называемых гипервирулентных штаммов (hypervirulent *K. pneumoniae*/hvKp) [7, 8]. Благодаря характерному для *K. pneumoniae* горизонтальному переносу генов все чаще стали регистрироваться случаи выделения множественно-резистентных hvKP, в т.ч. устойчивых к карбапенемам (CR-hvKP) [7, 9]. Распространение таких штаммов существенно ограничивает возможности лечения *K. pneumoniae*-инфекций и снижает эффективность применения разработанных лекарственных препаратов.

Одной из перспективных альтернатив использованию антибиотиков является терапия бактериофагами (фагами) – естественными киллерами, которые могут быстро и избирательно инфицировать и лизировать патогенные бактерии, в т.ч. устойчивые к антибиотикам [10–13]. Фаготерапия применяется в клинической практике с начала XX века, и за всю историю использования не было выявлено сколько-нибудь существенных побочных эффектов [14].

Естественным ограничением фаготерапии являются высокая специфичность и узкий круг хозяев отдельных бактериофагов. Поэтому для борьбы с неизвестным патогеном приходится использовать фаговые коктейли. Диапазон хозяев многих бактериофагов *K. pneumoniae* коррелирует с типом капсульного полисахарида (CPS) – ключевого фактора вирулентности, защищающего бактерии от фагоцитоза, бактерицидного действия комплемента сыворотки крови, антимикробных пептидов организма-хозяина и некоторых

антибиотиков [15, 16]. Известно более 130 типов CPS, включая 77 К-типов, распознаваемых серологическим типированием [17], и новые К-типы, определенные секвенированием ДНК-локуса, ответственного за синтез капсулы (К-локус (KL)) [18]. Упомянутые выше штаммы hvKp обладают, как правило, гипермукоидным (hypermucoviscosity/HM) фенотипом, связанным с гиперэкспрессией капсульных полисахаридов. Чаще всего HM-фенотип ассоциируется с капсульными типами K1 и K2, реже – с K5, K16, K20, K54, K57 [19, 20]. В связи с выраженной капсулоспецифичностью фагов *K. pneumoniae* актуальным является создание банка охарактеризованных фагов, лизирующих штаммы разных капсульных типов, выявление и изучение белков, определяющих специфичность бактериофагов, в частности полисахарид-деполимераз, способных связываться и расщеплять поверхностные полисахариды патогенных *K. pneumoniae*.

Цель работы – выделение и молекулярно-генетическая характеристика нового литического бактериофага, активного против *K. pneumoniae* капсульного типа K23, и выявление в фаговом геноме генов, кодирующих полисахарид-деполимеразы.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия их выращивания

В работе использовали 52 штамма *K. pneumoniae*, выделенных из крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) многопрофильного стационара в 2014 г.

Для культивирования гемокультур использовали бактериологический анализатор «Юнона Labstar» (Scenker Biological Technology, Китай). Идентификацию бактерий и определение чувствительности к антибиотикам проводили с использованием масс-спектрометра VITEK MS и анализатора VITEK-2 Compact (bioMérieux, Франция). Выделенные штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск); геномы всех штаммов секвенированы [21, 22]. Кроме того, использовали штаммы других представителей из группы ESKAPE-патогенов: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* sp., полученные из ГКПМ-Оболенск. Бактериальные культуры выращивали в жидкой питательной среде

«ГРМ-бульон» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и на плотной питательной среде «ГРМ-агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Выделение и размножение бактериофага

Бактериофаги выделяли методом обогащения из флаконов гемокультур, в которых были выявлены *K. pneumoniae*. Пробу обрабатывали хлороформом и центрифугировали в низкоскоростном режиме (6000 g, 20 мин). Надосадочную жидкость фильтровали через мембранные фильтры диаметром 0,22 и 0,45 мкм (Millipore, США). Фильтрат смешивали с суспензией бактериальных клеток *K. pneumoniae*, принадлежащих к различным капсульным типам, и культивировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем в пробы добавляли хлороформ и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин. Супернатанты фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм для удаления бактериальных клеток. Наличие бактериофагов в полученных образцах подтверждали методом spot-теста [23]. На бактериальный газон наносили 10–40 мкл фильтрата фага и культивировали в течение 18–24 ч при температуре 37°C. Литическую активность фага фиксировали по наличию зон лизиса на бактериальном газоне. Отобранные с бактериальных газонов негативные колонии (бляшки фага) помещали в SM-буфер (10 mM Трис-HCl, pH 7,5, 10 mM MgSO₄ и 100 mM NaCl) и проводили очистку бактериофага с помощью трехкратных последовательных пересевов бляшек на газоне чувствительных штаммов *K. pneumoniae*.

Для размножения фага использовали штамм *K. pneumoniae* KPS43107-1 (B-16465) капсульного типа K23 [22]. Культуру штамма-хозяина выращивали в жидкой питательной среде «ГРМ-бульон» в условиях аэрации при температуре 37°C до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,3–0,4; вносили препарат фага при кратности заражения MOI = 0,1 и культивировали до лизиса бактериальной культуры. Для удаления клеточного дебриса к смеси добавляли хлороформ и центрифугировали 5 мин при 13 000 g. Титр препарата бактериофага определяли методом агаровых слоев Грация [23].

Электронная микроскопия

Препарат бактериофага с титром 10⁹ БОЕ/мл наносили на медные подложки Formvar для электронно-микроскопических исследований. После высушивания образец окрашивали 0,3%-м водным раствором уранилацетата (pH 4,0). Исследования проводили на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Спектр литического действия бактериофага

Специфичность и круг хозяев бактериофага определяли капельным методом (spot-тест). Бактериальные культуры (10⁹ КОЕ/мл) смешивали с 4 мл полужидкого агара (0,5%-й агарозы) и распределяли по поверхности чашек с плотной питательной средой «ГРМ-агар». Затем на поверхность агара наносили по 10 мкл последовательных десятикратных разведений бактериофага и культивировали 18–24 ч при температуре 37°C.

Адсорбция фага на клетках *K. pneumoniae*

Клетки *K. pneumoniae* KPS43107-1 выращивали до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,3 (10⁹ КОЕ/мл). Бактериальную

суспензию смешивали с фагом (10⁶ БОЕ/мл) и инкубировали при комнатной температуре. Пробы отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 и 20 мин (по 100 мкл) в SM-буфер с хлороформом и центрифугировали при 10 000 g 3–5 мин. Для определения количества неадсорбированных фагов в различных временных интервалах проводили титровку надосадочной жидкости с последующим высевом на плотную питательную среду «ГРМ-агар» по методу агаровых слоев и культивированием в течение 18–24 ч при температуре 37°C. Константу скорости адсорбции измеряли по падению титра свободного фага [23].

Одиночный цикл размножения бактериофага

Для определения одиночного цикла развития фага бактериальные клетки штамма-хозяина выращивали до логарифмической фазы роста (OD₆₀₀ = 0,3), осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 1 мл жидкой питательной среды «ГРМ-бульон» и смешивали с фагом при множественности инфицирования 1:100. Смесь инкубировали в течение 5 мин при температуре 37°C. Для удаления неадсорбированных фаговых частиц образцы центрифугировали при 10 000 g 3 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл жидкой питательной среды «ГРМ-бульон» и инкубировали в течение 120 мин, отбирая пробы через каждые 5 мин для определения титра фага по методу агаровых слоев.

Устойчивость фага KpV17Skliif к температуре и pH среды

Температурную устойчивость бактериофага KpV17Skliif определяли после инкубации фаголизата при различных температурах (8, 24, 37, 42, 56 и 70°C) в течение 1 ч. Для оценки стабильности KpV17Skliif при различных pH суспензию фага (10⁸ БОЕ/мл) инкубировали в растворах со значениями pH от 3,2 до 12 в течение 1 ч. Влияние температуры и pH среды на стабильность фага KpV17Skliif оценивали при помощи определения титра бактериофага стандартным двухслойным методом [23].

Выделение и секвенирование фаговой ДНК

Выделение ДНК бактериофага проводили методом фенол-хлороформной экстракции [24]. Фаголизат инкубировали 2 ч при температуре 37°C в SM-буфере с добавлением 0,5 M ЭДТА, 10% SDS и 20 мг/мл протеиназы K и прогревали при температуре 56°C в течение 20 мин. Далее в пробу добавляли равный объем фенол/хлороформной смеси, центрифугировали 5 мин при 10 000 об./мин, осторожно отбирали верхнюю водную фазу и проводили очистку ДНК от белковых примесей с помощью изоамилового и этилового спиртов. Полученный осадок растворяли в 40 мкл TE-буфера. Образец ДНК фага KpV17Skliif хранили при температуре -20°C. Секвенирование генома фага проводили на платформе Unicycler v.0.4.7 с технологией сборки генома Genolab M.

Биоинформатический анализ данных

Аннотирование геномных последовательностей бактериофага осуществляли при помощи программ GeneMark [25], RAST [26] и NCBI BLAST [27]. Генетические карты визуализировали с помощью SnapGene Viewer v 6.2.1. Для определения полисахарид-деполимеризующего домена использовали сервер HHPred [28] и базу данных NCBI BLAST [26].

Типирование капсульных локусов ранее секвенированных геномов *K. pneumoniae* [22] и определение капсульных типов (К-типов) проводили с помощью веб-ресурса Kaptive Web [29].

Филогенетическую реконструкцию проводили с использованием PhyML+SMS/OneClick-алгоритма (параметры по умолчанию) веб-сервиса NGPhylogeny.fr [30]. Дендрограммы воспроизводили с помощью сервиса iTOL [31].

Результаты исследования и их обсуждение

Выделение бактериофага и его морфологическая характеристика

Бактериофаг KpV17Skliif выделен из крови пациента, находящегося на лечении в ОРИТ многопрофильного стационара, методом обогащения с использованием штаммов *K. pneumoniae* 12 К-типов (K1, K2, K17, K20, K23, K39, K48, K57, K64, K102, K107, K112), включая штамм KPS78054 К-типа K48, выделенный из крови этого же пациента. Как оказалось при дальнейшем исследовании, выделенный бактериофаг не лизирует клетки штамма KPS78054, а для его размножения может быть использован штамм *K. pneumoniae* KPS43107-1 (капсульный тип K23), полученный из крови другого пациента ОРИТ.

На бактериальном газоне штамма *K. pneumoniae* KPS43107-1 фаг KpV17Skliif образует прозрачные негативные колонии диаметром 2–4 мм с ореолом (рис. 1А). Образование ореола указывает на наличие ферментов, разрушающих полисахаридный слой бактериальных клеток (деполимераз).

При электронной микроскопии вирусных частиц KpV17Skliif были выявлены икосаэдрические головки диаметром 45 нм с коротким хвостовым отростком (рис. 1В), что соответствует морфологической характеристике подовирусов [32].

Специфичность и спектр литического действия фага KpV17Skliif

При изучении спектра литического действия бактериофага KpV17Skliif с использованием 52 штаммов *K. pneumoniae* разных К-типов, а также штаммов *A. baumannii* ($n = 5$), *P. aeruginosa* ($n = 3$), *Enterobacter* sp., *E. faecium* и *S. aureus* ($n = 3$) было показано, что фаг обладает высоким уровнем

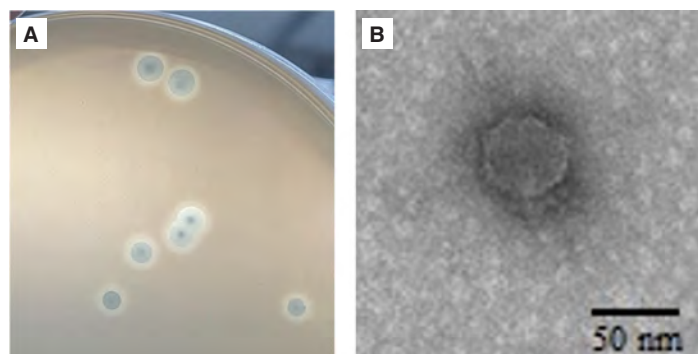


Рис. 1. Морфологические характеристики бактериофага KpV17Skliif: А) фаговые бляшки на газоне штамма *K. pneumoniae* KPS43107-1; В) электронная микрофотография вириона бактериофага (масштабная линейка 50 нм).

Fig. 1. Morphological characteristics of the bacteriophage KpV17Skliif: А) phage plaques on a lawn of the *K. pneumoniae* strain KPS43107-1; В) electron micrograph of the bacteriophage virion (scale bar 50 nm).

Таблица. Спектр литического действия бактериофага KpV17Skliif
Table. Spectrum of lytic action of bacteriophage KpV17Skliif

Вид / Species	К-тип / K-type	Кол-во штаммов / Number of strains	Чувствительность к фагу / Sensitivity to phage
<i>K. pneumoniae</i>	1	2	–
	2	5	–
	17	4	–
	20	3	–
	23	11	+
	39	2	–
	48	10	–
	57	1	–
	64	6	–
	102	1	–
	107	6	–
	112	1	–
<i>A. baumannii</i>	–	5	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	3	–
<i>E. species</i>	–	1	–
<i>E. faecium</i>	–	1	–
<i>S. aureus</i>	–	3	–

специфичности: лизирует штаммы *K. pneumoniae* К-типа K23 и не проявляет литической активности в отношении *K. pneumoniae* других К-типов, а также других патогенов группы ESKAPE (таблица).

Адсорбция и одиночный цикл размножения фага KpV17Skliif

Изучение количественных параметров вновь характеризуемых фагов дает ценную информацию о кинетике и эффективности репликации и высвобождения фага в популяции бактерий-хозяев.

Процесс фаговой инфекции исследовали путем оценки скорости адсорбции и определения одиночного цикла размножения фага KpV17Skliif на клетках *K. pneumoniae* KPS43107-1. Как следует из данных, представленных на рис. 2А, фаг быстро адсорбируется на клетках штамма-хозяина; >90% фаговых частиц адсорбируется в течение 4 мин. Константа адсорбции KpV17Skliif составила $4,0 \cdot 10^{-7}$ мл/мин.

Результаты эксперимента по определению одиночного цикла размножения фага показали, что латентный период фага KpV17Skliif составляет 10 мин, за ним следует такой же короткий период подъема (увеличение концентрации фаговых частиц) продолжительностью 10 мин и фаза плато. Выход фага составляет ~28 фаговых частиц на одну инфицированную клетку (рис. 2В).

Влияние температуры и pH на выживаемость фага KpV17Skliif

Изучение стабильности фага при различных значениях температуры и pH показало, что фаг остается активным в диапазоне pH от 4 до 9, но только 0,1% фагов сохраняют способность инфицировать клетки штамма-хозяина при pH 3, и ~3% – при pH 11 (рис. 2С). Инфекционная активность

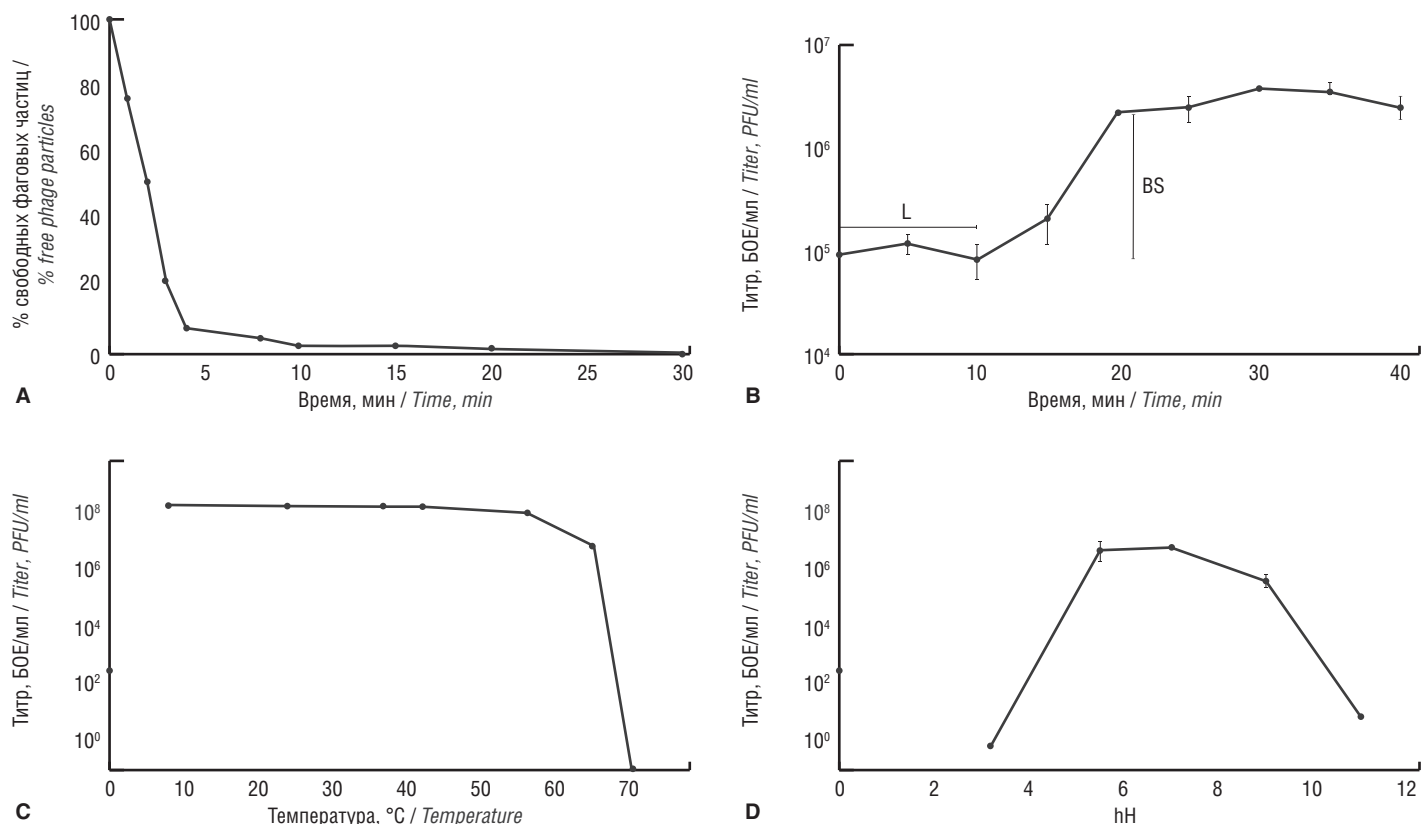


Рис. 2. Характеристики литической активности бактериофага KpV17SkIf: А) адсорбция фага на клетках *K. pneumoniae* KPS43107-1; В) одиночный цикл размножения фага на клетках штамма *K. pneumoniae* KPS43107-1 (отмечена продолжительность латентного периода – L и выход фаговых частиц – BS); С) влияние температуры на жизнеспособность фага KpV17SkIf; D) влияние pH на жизнеспособность фага KpV17SkIf.

Fig. 2. Characteristics of the lytic activity of the bacteriophage KpV17SkIf: A) phage KpV17SkIf adsorption on *K. pneumoniae* KPS43107-1 cells; B) one-step growth curve of KpV17SkIf phage on *K. pneumoniae* strain KPS43107-1 with indication of estimated burst size (BS) and latent period (L); C) the effect of temperature on the viability of the phage KpV17SkIf; D) the effect of pH on the viability of the phage KpV17SkIf.

бактериофага оставалась неизменно стабильной при температуре от 8 до 56°C. Аналогичная стабильность в этом диапазоне температур была отмечена у ранее охарактеризованных K23-специфичных фагов разных морфотипов: Seu621 и KpS8 рода *Mydovirus* и *Drulivirus* Dlv622 [33]. Следует отметить, что бактериофаг KpV17SkIf, так же как фаги Seu621 и KpS8, сохранял высокую бляшкообразующую активность даже после инкубации при 65°C, что указывает на его хорошую термостабильность (рис. 2B). Стабильность фага KpV17SkIf в различных условиях окружающей среды имеет решающее значение для его эффективного применения в борьбе с инфекциями, вызванными *K. pneumoniae* К-типа K23. Широкий спектр температурной устойчивости является ценным свойством для разработки препаратов на

основе данного фага для перорального, местного или даже системного применения.

Секвенирование и анализ генома фага KpV17SkIf

Геном фага KpV17SkIf представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 43 443 пары нуклеотидов и GC-составом 53,8%. Определены 53 открытые рамки считывания (ORF) – потенциальные гены, кодирующие полипептиды размером >50 аминокислотных остатков. Все идентифицированные гены транскрибируются в одном направлении, 49 ORF начинаются с кодона ATG, четыре – с TTG. Гены, кодирующие тРНК, в геноме фага не выявлены (рис. 3).

На основании гомологии с аминокислотными последовательностями известных фаговых белков предполагаемые

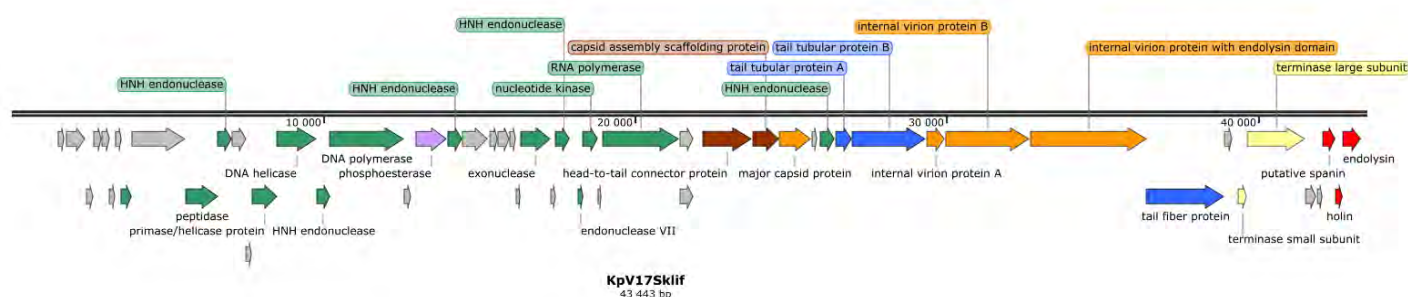


Рис. 3. Структура генома бактериофага KpV17SkIf.

Fig. 3. Genome structure of the bacteriophage KpV17SkIf.

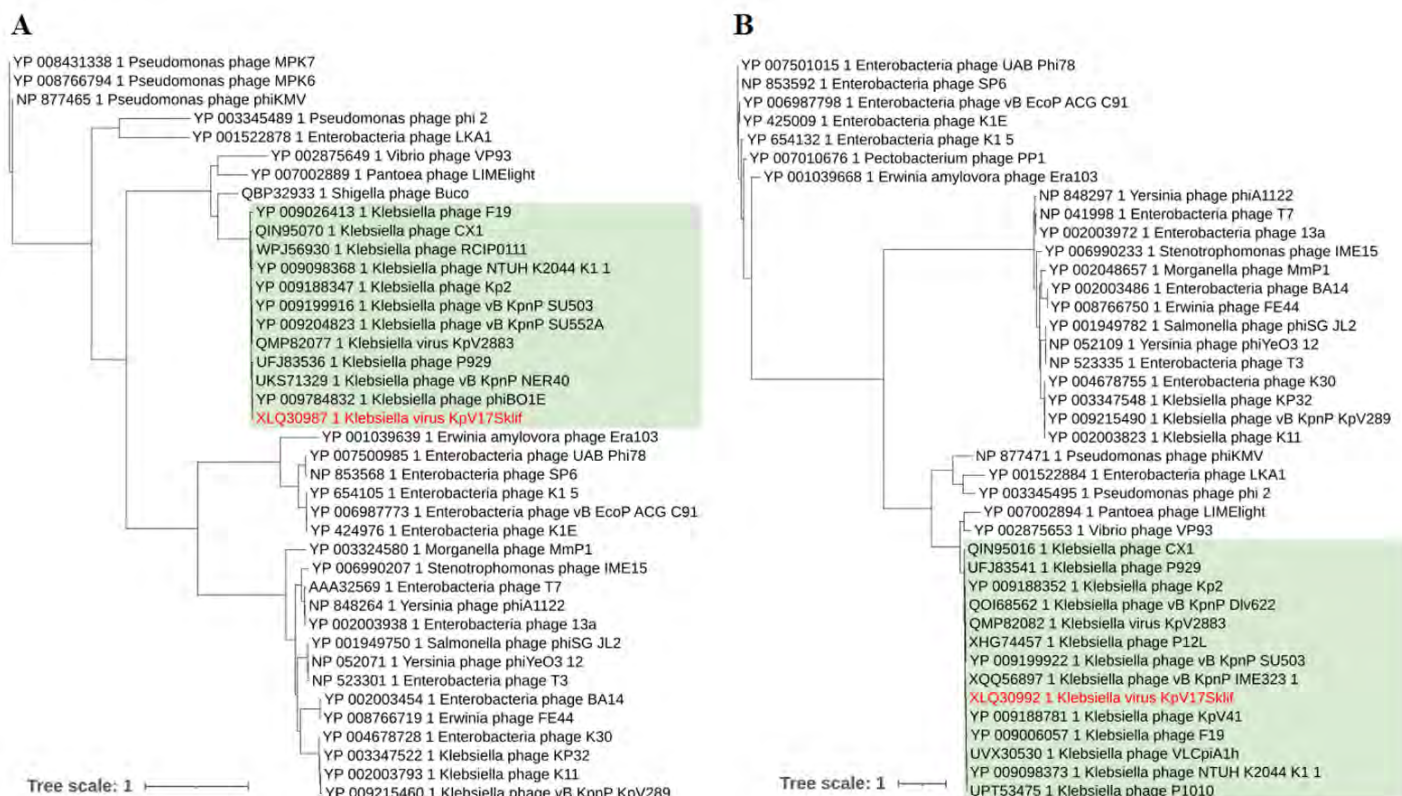


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе выравнивания аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы (А) и основного белка капсида (В) бактериофагов семейства *Autographiviridae*. Бактериофаги рода *Drulisvirus* маркированы зеленым.

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed based on the alignment of amino acid sequences of RNA polymerase (A) and major capsid protein (B) of bacteriophages of the *Autographiviridae* family. Bacteriophages of the genus *Drulisvirus* are marked in green.

функции были определены для продуктов 28 ORF, включая белки, участвующие в репликации ДНК (АТФ-зависимая ДНК-хеликаза, праймаза/хеликаза и ДНК-полимераза), транскрипции (ДНК-зависимая РНК-полимераза), упаковке ДНК в капсид (терминаза, большая и малая субъединицы), лизисе бактериальных клеток (холин, эндолизин и спанин), а также структурные белки фага (основной белок капсида, внутренние белки вириона, тубулярные белки хвоста и белки хвостовых фибрилл).

Продукты остальных 25 ORF имели сходство с гипотетическими фаговыми белками, представленными в базах данных NCBI, однако их функции неизвестны (рис. 3). Каких-либо генов или фрагментов ДНК, свидетельствующих о возможном лизогенном пути развития фага, не обнаружено. Не выявлено также гомологии с известными детерминантами устойчивости к антибиотикам, бактериальными белками вирулентности или токсинами.

Таким образом, результаты проведенного анализа показали, что бактериофаг KpV17Skliif имеет типичную организацию генома фага T7 с наличием кассеты лизиса, состоящей из расположенных рядом генов, кодирующих спанин, холин и эндолизин, а также фаговых ДНК- и РНК-полимераз.

Сравнительный геномный анализ выявил высокую гомологию между ДНК фага KpV17Skliif и бактериофагов семейства *Autographiviridae* подсемейства *Slopekvirinae*. Наиболее близкими к этому фагу по нуклеотидному составу генома оказались литические фаги рода *Drulisvirus* P929 (GenBank: OK562429.1) и CX1 (GenBank: MT090077.2), выделенные в

Китае, – идентичность составляет 93% (при покрытии 81–82%), что ниже принятого порога сходства геномов фагов внутри одного вида. Геномные различия >5% предполагают принадлежность фага KpV17Skliif к новому виду вирусов в пределах рода *Drulisvirus*. Таксономическая связь KpV17Skliif с фагами рода *Drulisvirus* подтверждена филогенетическим анализом, основанным на множественных выравниваниях аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы и основного белка капсида представителей разных родов семейства *Autographiviridae* (рис. 4).

Анализ хвостовых белков фага и выявление белка с полисахарид-деполимеризующей активностью

Специфичность по отношению к *K. pneumoniae* определенного К-типа (таблица) и наличие полупрозрачного ореола вокруг негативных колоний KpV17Skliif (рис. 1А) предполагают наличие в составе хвостового аппарата этого фага белка с CPS-деполимеризующей активностью – полисахарид-деполимеразы. BLAST-анализ полипептидных последовательностей KpV17Skliif показал, что белок хвостовой фибриллы Skif45, кодируемый ORF45, содержит N-концевой домен, схожий с рецептор-связывающим доменом TSP1/Grp66 спайковых белков эшерихиозных бактериофагов CBA120 [34] и G7C [35]. Наличие подобных доменов характерно для многих деполимераз (GenBank: UKM17348.1 [36]; YP_010676313.1 [37]; YP_009796379.1 [38]). Последующий анализ с помощью интерактивного сервера HHpred [28] показал, что белок Skif45 имеет структурную гомологию с

другим белком фага CBA120 – TSP3 (HHpred-вероятность 99,97%), содержащим рецептор-связывающий домен, аналогичный TSP1, и каталитический эндогликозидазный домен [39]. По результатам HHpred-анализа также установлено, что белок Skif45 имеет выраженную структурную гомологию (HHpred-вероятность >99%) с белком хвостового спайка фага K64 (ORF41), расщепляющего полисахариды *K. pneumoniae* капсульного типа K64 [40], и аналогичным белком фага phiAB6, который специфически гидролизует экзополисахариды *A. baumannii* [41]. Все упомянутые выше белки имеют характерную для фаговых деполимераз β -складчатую трехмерную архитектуру [39-41]. Таким образом, на основании проведенного анализа с большой долей вероятности можно предположить, что белок Skif45 содержит рецептор-связывающий и каталитический домены, присущие полисахарид-деполимеризующим структурным ферментам бактериофагов.

Закключение

В представленной работе охарактеризованы биологические свойства и геномная организация бактериофага KpV17Skif, высокоспецифичного по отношению к *K. pneumoniae* капсульного типа K23. Бактериофаг депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» (регистрационный номер Ph-193); геном фага представлен в международную базу GenBank под номером PQ663821. На основании результатов геномного и филогенетического анализа установлена принадлежность бактериофага к роду *Drulisvirus* семейства *Autographiviridae*. Показано, что фаг KpV17Skif имеет типичную организацию генома T7-подобных бактериофагов с наличием собственных генов ДНК- и РНК-полимераз, а также характерной кассеты лизиса, состоящей из расположенных рядом генов спанина, холина и эндолизина. В геноме фага не обнаружены гены, ассоциированные с устойчивостью к антибактериальным агентам, а также гены, ответственные за лизогенный путь развития бактериофага. Предполагается, что выраженная K23-специфичность фага KpV17Skif связана с наличием гена, кодирующего рецептор-связывающий белок Skif45 с доменом полисахарид-деполимеризации. Полученные результаты указывают на потенциал использования фага KpV17Skif как средства идентификации *K. pneumoniae* K-типа K23, а также как одного из компонентов фагового коктейля для борьбы с инфекциями, вызванными *K. pneumoniae*. В свою очередь, выявление закодированного в геноме фага белка Skif45, определяющего активность фага в отношении *K. pneumoniae* K-типа K23, является предметом дальнейших исследований, направленных на изучение структуры, особенностей и механизмов действия этого пептида, а также его роли в процессе взаимодействия фага с бактериальной клеткой.

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. Комисарова ЕВ, Воложанцев НВ. Гипервирулентная *Klebsiella pneumoniae* – новая инфекционная угроза. Инфекционные болезни. 2019;17(3):81-89. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89
2. Чеботарь ИВ, Бочарова ЮА, Подопригора ИВ, Шагин ДА. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19
3. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(17):6278. DOI: 10.3390/ijerph17176278
4. Namikawa H, Oinuma KI, Kaneko Y, Takeya H, Shuto T. Antimicrobial resistance in hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. Emerg Microbes Infect. 2024; 4:2438657. DOI: 10.1080/22221751.2024.2438657
5. Han YL, Wen XH, Zhao W, Cao XS, Wen JX, Wang JR, et al. Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2022;13:1003783. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1003783
6. Li D, Huang X, Rao H, Yu H, Long S, Li Y, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1157010. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1157010
7. Dong N, Yang X, Chan EW, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. EBioMedicine. 2022; 79:103998. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103998
8. Kocsis B. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An update on epidemiology, detection and antibiotic resistance. Acta Microbiol Immunol Hung. 2023;70(4):278-287. DOI: 10.1556/030.2023.02186
9. Pu D, Zhao J, Chang K, Zhuo X, Cao B. "Superbugs" with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China. Sci Bull (Beijing). 2023; 68(21):2658-2670. DOI: 10.1016/j.scib.2023.09.040
10. Górski A, Międzybrodzki R, Żaczek M, Borysowski J. Phages in the fight against COVID-19? Future Microbiol. 2020;15:1095-1100. DOI: 10.2217/fmb-2020-0082
11. Комисарова ЕВ, Красильникова ВМ, Воложанцев НВ. Бактериофаги, фаговые полисахарид-деполимеразы и возможности их использования для лечения бактериальных инфекций. Бактериология. 2019;4(4):7-14. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-7-14
12. Payne RJ, Phil D, Jansen VA. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. Clin Pharmacol Ther. 2000;68(3):225-30. DOI: 10.1067/mcp.2000.109520
13. Kou X, Yang X, Zheng R. Challenges and opportunities of phage therapy for *Klebsiella pneumoniae* infections. Appl Environ Microbiol. 2024;90(10):e0135324. DOI: 10.1128/aem.01353-24
14. Abbas S, Kanwar R, Ullah K, Kanwal R, Tajamal M, Aslam MA, et al. Bacteriophage therapy: a possible alternative therapy against antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2025;16:1443430. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1443430
15. Cortes G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Saulea J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. Infect Immun. 2002;70(5):2583-90. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2583-2590.2002

16. Domenico P, Salo RJ, Cross AS, Cunha BA. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1994;62(10):4495-9. DOI: 10.1128/iai.62.10.4495-4499.1994
17. Ørskov I, Fife-Asbury MA. New *Klebsiella* capsular antigen K82 and the deletion of five of those previously assigned. Int J Syst Bacteriol. 1977;27:386-387. DOI: 10.1099/00207713-27-4-386
18. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genom. 2016;2(12):e000102. DOI: 10.1099/mgen.0.000102
19. Al Ismail D, Campos-Madueno EI, Donà V, Endimiani A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp): Overview, Epidemiology, and Laboratory Detection. Pathog Immun. 2025;10(1):80-119. DOI: 10.20411/pai.v10i1.777
20. Volozhantsev NV, Shpirt AM, Borzilov AI, Komisarova EV, Krasilnikova VM, Shashkov AS, et al. Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. Antibiotics (Basel). 2020;9(11):732. DOI: 10.3390/antibiotics9110732
21. Kolupaeva NV, Kolupaeva LV, Evseev PV, Skryabin YP, Lazareva EB, Chernenkaya TV, et al. *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Intensive Care Unit Patients in 2024: General Characterization, Prophages, Depolymerases and Esterases of Phage Origin. Viruses. 2025;17(5):623. DOI: 10.3390/v17050623
22. Колупаева ЛВ, Колупаева НВ, Лебедева АЮ, Соломенцев ВИ, Сизова АА, Фурсов МВ, и др. Геномные последовательности изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии в 2024 г. Бактериология. 2025;10(1):116-118. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-116-118
23. Adams MH. Bacteriophages. Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1959.
24. Green MR, Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012;1890.
25. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. Nucleic Acids Res. 2001;29(12):2607-18. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607
26. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. 2008;9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
28. Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, et al. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred Server at its Core. J Mol Biol. 2018;430(15):2237-2243. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.007
29. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes. J Clin Microbiol. 2018;56(6):e00197-18. DOI: 10.1128/JCM.00197-18
30. Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. Nucleic Acids Res. 2019;47(1):260-265. DOI: 10.1093/nar/gkz303
31. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. Nucleic Acids Res. 2024;52(1):78-82. DOI: 10.1093/nar/gkz268
32. Ackermann HW. Basic phage electron microscopy. Methods Mol Biol. 2009;501:113-26. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_12
33. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. Front Microbiol. 2021;12:669618. DOI: 10.3389/fmicb.2021.669618
34. Chen C, Bales P, Greenfield J, Heselpoth RD, Nelson DC, Herzberg O. Crystal structure of ORF210 from *E. coli* O157:H1 phage CBA120 (TSP1), a putative tailspike protein. PLoS One. 2014;9(3):e93156. DOI: 10.1371/journal.pone.0093156
35. Prokhorov NS, Riccio C, Zdorovenko EL, Shneider MM, Browning C, Knirel YA, et al. Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption. Mol Microbiol. 2017;105(3):385-398. DOI: 10.1111/mmi.13710
36. Sattar S, Bailie M, Yaqoob A, Khanum S, Fatima K, Altaf AURB, et al. Characterization of two novel lytic bacteriophages having lysis potential against MDR avian pathogenic *Escherichia coli* strains of zoonotic potential. Sci Rep. 2023;13(1):10043. DOI: 10.1038/s41598-023-37176-z
37. Sousa JC, Sillankorva S, Faustino A, Carvalho CM. Suggestion for a new bacteriophage genus for the *Klebsiella pneumoniae* phage vB_KpnS-Carvaje. Curr Genet. 2022;68(3-4):393-406. DOI: 10.1007/s00294-022-01242-2
38. Newkirk HN, Lessor L, Gill JJ, Liu M. Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Myophage Menlow. Microbiol Resour Announc. 2019;8(17):e00192-19. DOI: 10.1128/MRA.00192-19
39. Greenfield J, Shang X, Luo H, Zhou Y, Heselpoth RD, Nelson DC, et al. Structure and tailspike glycosidase machinery of ORF212 from *E. coli* O157:H7 phage CBA120 (TSP3). Sci Rep. 2019;9(1):7349. DOI: 10.1038/s41598-019-43748-9
40. Huang T, Zhang Z, Tao X, Shi X, Lin P, Liao D, et al. Structural and functional basis of bacteriophage K64-ORF41 depolymerase for capsular polysaccharide degradation of *Klebsiella pneumoniae* K64. Int J Biol Macromol. 2024; 265(2):130917. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130917
41. Lee IM, Tu IF, Yang FL, Ko TP, Liao JH, Lin NT, et al. Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage Φ AB6 tailspike protein. Sci Rep. 2017;7:42711. DOI: 10.1038/srep42711

References

1. Komisarova EV, Volozhantsev NV. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. Infekc. bolezni (Infectious Diseases). 2019;17(3):81-89. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89 (In Russian).
2. Chebotar IV, Bocharova YA, 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/cmacc.2020.1.4-19 (In Russian).
3. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(17):6278. DOI: 10.3390/ijerph17176278
4. Namikawa H, Oinuma KI, Kaneko Y, Kakeya H, Shuto T. Antimicrobial resistance in hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. Emerg Microbes Infect. 2024; 4:2438657. DOI: 10.1080/22221751.2024.2438657
5. Han YL, Wen XH, Zhao W, Cao XS, Wen JX, Wang JR, et al. Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2022;13:1003783. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1003783
6. Li D, Huang X, Rao H, Yu H, Long S, Li Y, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1157010. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1157010
7. Dong N, Yang X, Chan EW, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. EBioMedicine. 2022; 79:103998. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103998
8. Kocsis B. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An update on epidemiology, detection and antibiotic resistance. Acta Microbiol Immunol Hung. 2023;70(4):278-287. DOI: 10.1556/030.2023.02186
9. Pu D, Zhao J, Chang K, Zhuo X, Cao B. "Superbugs" with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China. Sci Bull (Beijing). 2023; 68(21):2658-2670. DOI: 10.1016/j.scib.2023.09.040

10. Górski A, Międzybrodzki R, Żaczek M, Borysowski J. Phages in the fight against COVID-19? Future Microbiol. 2020;15:1095-1100. DOI: 10.2217/fmb-2020-0082
11. Komisarova EV, Krasilnikova VM, Volozhantsev NV. Bacteriophages, phage polysaccharide depolymerases and the possibility of their use for the treatment of bacterial infections. Bacteriology. 2019;4(4):7-14. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-7-14 (In Russian).
12. Payne RJ, Phil D, Jansen VA. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. Clin Pharmacol Ther. 2000;68(3):225-30. DOI: 10.1067/mcp.2000.109520
13. Kou X, Yang X, Zheng R. Challenges and opportunities of phage therapy for *Klebsiella pneumoniae* infections. Appl Environ Microbiol. 2024;90(10):e0135324. DOI: 10.1128/aem.01353-24
14. Abbas S, Kanwar R, Ullah K, Kanwal R, Tajamal M, Aslam MA, et al. Bacteriophage therapy: a possible alternative therapy against antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2025;16:1443430. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1443430
15. Cortes G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Saulea J, Alberti S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. Infect Immun. 2002;70(5):2583-90. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2583-2590.2002
16. Domenico P, Salo RJ, Cross AS, Cunha BA. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1994;62(10):4495-9. DOI: 10.1128/iai.62.10.4495-4499.1994
17. Ørskov I, Fife-Asbury MA. New *Klebsiella* capsular antigen K82 and the deletion of five of those previously assigned. Int J Syst Bacteriol. 1977;27:386-387. DOI: 10.1099/00207713-27-4-386
18. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genom. 2016;2(12):e000102. DOI: 10.1099/mgen.0.000102
19. Al Ismail D, Campos-Madueno EI, Donà V, Endimiani A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp): Overview, Epidemiology, and Laboratory Detection. Pathog Immun. 2025;10(1):80-119. DOI: 10.20411/pai.v10i1.777
20. Volozhantsev NV, Shpirt AM, Borzilov AI, Komisarova EV, Krasilnikova VM, Shashkov AS, et al. Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. Antibiotics (Basel). 2020;9(11):732. DOI: 10.3390/antibiotics9110732
21. Kolupaeva NV, Kolupaeva LV, Evseev PV, Skryabin YP, Lazareva EB, Chernenkaya TV, et al. *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Intensive Care Unit Patients in 2024: General Characterization, Prophages, Depolymerases and Esterases of Phage Origin. Viruses. 2025;17(5):623. DOI: 10.3390/v17050623
22. Kolupaeva LV, Kolupaeva NV, Lebedeva AY, Solomentsev VI, Sizova AA, Fursov MV, et al. 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. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-116-118 (In Russian).
23. Adams MH. Bacteriophages. Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1959.
24. Green MR, Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012;1890.
25. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. Nucleic Acids Res. 2001;29(12):2607-18. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607
26. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. 2008;9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
28. Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, et al. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred Server at its Core. J Mol Biol. 2018;430(15):2237-2243. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.007
29. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes. J Clin Microbiol. 2018;56(6):e00197-18. DOI: 10.1128/JCM.00197-18
30. Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. Nucleic Acids Res. 2019;47(1):260-265. DOI: 10.1093/nar/gkz303
31. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. Nucleic Acids Res. 2024;52(1):78-82. DOI: 10.1093/nar/gkae268
32. Ackermann HW. Basic phage electron microscopy. Methods Mol Biol. 2009;501:113-26. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_12
33. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. Front Microbiol. 2021;12:669618. DOI: 10.3389/fmicb.2021.669618
34. Chen C, Bales P, Greenfield J, Heselpoth RD, Nelson DC, Herzberg O. Crystal structure of ORF210 from *E. coli* O157:H1 phage CBA120 (TSP1), a putative tailspike protein. PLoS One. 2014;9(3):e93156. DOI: 10.1371/journal.pone.0093156
35. Prokhorov NS, Riccio C, Zdorovenko EL, Shneider MM, Browning C, Knirel YA, et al. Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption. Mol Microbiol. 2017;105(3):385-398. DOI: 10.1111/mmi.13710
36. Sattar S, Bailie M, Yaqoob A, Khanum S, Fatima K, Altaf AURB, et al. Characterization of two novel lytic bacteriophages having lysis potential against MDR avian pathogenic *Escherichia coli* strains of zoonotic potential. Sci Rep. 2023;13(1):10043. DOI: 10.1038/s41598-023-37176-z
37. Sousa JC, Sillankorva S, Faustino A, Carvalho CM. Suggestion for a new bacteriophage genus for the *Klebsiella pneumoniae* phage vB_KpnS-Carvaje. Curr Genet. 2022;68(3-4):393-406. DOI: 10.1007/s00294-022-01242-2
38. Newkirk HN, Lessor L, Gill JJ, Liu M. Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Myophage Menlow. Microbiol Resour Announc. 2019;8(17):e00192-19. DOI: 10.1128/MRA.00192-19
39. Greenfield J, Shang X, Luo H, Zhou Y, Heselpoth RD, Nelson DC et al. Structure and tailspike glycosidase machinery of ORF212 from *E. coli* O157:H7 phage CBA120 (TSP3). Sci Rep. 2019;9(1):7349. DOI: 10.1038/s41598-019-43748-9
40. Huang T, Zhang Z, Tao X, Shi X, Lin P, Liao D, et al. Structural and functional basis of bacteriophage K64-ORF41 depolymerase for capsular polysaccharide degradation of *Klebsiella pneumoniae* K64. Int J Biol Macromol. 2024; 265(2):130917. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130917
41. Lee IM, Tu IF, Yang FL, Ko TP, Liao JH, Lin NT, et al. Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage Φ AB6 tailspike protein. Sci Rep. 2017;7:42711. DOI: 10.1038/srep42711

Информация о соавторах:

Сизова Анжелика Александровна, младший 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 ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Черненко Татьяна Витальевна, кандидат медицинских наук, заведующая научным отделением лаборатории клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Сузина Наталья Егоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цитологии микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина, ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Anzhelika A. Sizova, Junior Researcher, Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elena B. Lazareva, MD, PhD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology, N.V.Sklifosovsky Research Institute for Emergency Care, Moscow Department of Healthcare

Tatyana V. Chernenkaya, PhD, MD, Head of the Scientific Department of the Laboratory of Clinical Microbiology, N.V.Sklifosovsky Research Institute for Emergency Care, Moscow Department of Healthcare

Natalya E. Suzina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Microorganism Cytology, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms G.K.Skryabin, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences

Nikolay V. Volozhantsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Microbiology, Federal State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Покоящиеся листерии в продуктах питания

Бактерии, подвергшиеся стрессу, могут перейти в спящее жизнеспособное, но некультивируемое (VBNC) состояние. Патогены VBNC представляют повышенный риск для здоровья, поскольку их невозможно обнаружить методами, основанными на росте, и они могут снова просыпаться в вирулентном состоянии. Несмотря на широкое распространение среди бактерий, механизмы, управляющие этим фенотипическим переключением, остаются неуловимыми. Здесь мы исследуем переход состояния VBNC у человеческого патогена *Listeria monocytogenes*. Мы показываем, что бактерии, голодающие в минеральной воде, становятся VBNC, превращаясь в осмотически стабильные коккоидные формы с дефицитом клеточной стенки, явление, которое встречается у других видов *Listeria*. Мы раскрываем регулятор реакции бактерий на стресс SigB и аутолизин NamA как основные участники перехода состояния VBNC. Наконец, мы показываем, что VBNC *Listeria* возвращаются в окруженное стенкой и вирулентное состояние после пассажа в куриных эмбрионах. Наше исследование предоставляет более подробную информацию о механизмах перехода между состояниями VBNC, раскрывая, что бактерии без стенки, естественным образом возникающие в водной среде, являются потенциальной стратегией выживания в гипоосмотических и олиготрофных условиях.

Carvalho F, Carreaux A, Sartori-Rupp A, Tachon S, Gazi AD, Courtin P, et al.
Aquatic environment drives the emergence of cell wall-deficient dormant forms in Listeria.
Nat Commun. 2024 Oct 2;15(1):8499. DOI: 10.1038/s41467-024-52633-7

Изучение редких бактериальных геномов с помощью нового инструмента секвенирования

Выявление и секвенирование редких штаммов бактерий, составляющих микробиом человека, является сложной задачей для ученых. Генетики из Медицинской школы Икана в Маунт-Синай, разработали метод под названием mEnrich-seq для решения этой проблемы. Используя уникальные эпигенетические сигнатуры определенных бактериальных штаммов, mEnrich-seq может усилить сигнал интересующих штаммов более чем в 100 раз, не давая им заглушаться «шумом» распространенных видов. Этот метод секвенирования бактериального генома можно использовать для выявления штаммов, устойчивых к антибиотикам, например, у пациентов с инфекциями мочевыводящих путей, или для обнаружения полезных штаммов в образцах фекалий, которые можно использовать в качестве пробиотиков.

Cao L, Kong Y, Fan Y, Ni M, Tourancheau A, Ksiezarek M, et al.
mEnrich-seq: methylation-guided enrichment sequencing of bacterial taxa of interest from microbiome.
Nat Methods. 2024 Feb;21(2):236-246. DOI: 10.1038/s41592-023-02125-1

Факторы патогенности *Yersinia pseudotuberculosis*: мишени для аттенуации при создании живых и векторных вакцин

А.С.Трунякова, А.С.Вагайская, С.В.Дентовская

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

Yersinia pseudotuberculosis – энтеропатогенный представитель рода *Yersinia*, обладает высокой степенью генетического подобия с возбудителем чумы *Yersinia pestis*, но при этом менее патогенен, более стабилен генетически и может быть использован для создания вакцин, в т.ч. доставляемых перорально. В обзоре обобщено современное понимание основных факторов патогенности псевдотуберкулезного микроба. Проанализирован вклад отдельных факторов в патогенез псевдотуберкулеза и чумы. Рассмотрены подходы, перспективные для направленной аттенуации штаммов *Y. pseudotuberculosis* при создании живых и векторных вакцин для специфической профилактики иерсиниозов, бубонной и легочной чумы.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, фактор патогенности, молекулярная мишень, чума, иерсиниозы, вакцинопрофилактика

Для корреспонденции: Трунякова А.С., Вагайская А.С., Дентовская С.В. Факторы патогенности *Yersinia pseudotuberculosis*: мишени для аттенуации при создании живых и векторных вакцин. Бактериология. 2025; 10(2): 103–107. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-103-107

Pathogenicity factors of *Yersinia pseudotuberculosis*: targets for attenuation in the creation of live and vector vaccines

A.S.Trunyakova, A.S.Vagaiskaya, S.V.Dentovskaya

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

Yersinia pseudotuberculosis is an enteropathogenic bacteria of the genus *Yersinia*, which has a high degree of genetic similarity with the plague agent – *Yersinia pestis*, but is less pathogenic, more stable genetically and can be used to create vaccines, including those delivered orally. The review summarizes the current understanding of the main pathogenicity factors of *Y. pseudotuberculosis*. The contribution of individual factors to the pathogenesis of pseudotuberculosis and plague is analyzed. Promising approaches for targeted attenuation of *Y. pseudotuberculosis* strains in the creation of live and vector vaccines for the specific prevention of yersiniosis, bubonic and pneumonic plague are considered.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, pathogenicity factor, molecular target, plague, yersiniosis, vaccine prevention

For citation: Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., Dentovskaya S.V. Pathogenicity factors of *Yersinia pseudotuberculosis*: targets for attenuation in the creation of live and vector vaccines. Bacteriology. 2025; 10(2): 103–107. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-103-107

Воздействие инфекционных агентов и просто чужеродных антигенов на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта стимулирует синтез антител и клеточно-опосредованный иммунный ответ. Оральная доставка антигенов по-прежнему вызывает интерес при создании вакцин против инфекций, особенно передающихся фекально-оральным и аэрогенным путем. Индукция антител IgA обеспечивает специфическую защиту от многих респираторных, кишеч-

ных и генитальных инфекций. Рекомбинантные аттенуированные штаммы сальмонелл (RASV) используют для стимулирования иммунитета либо к данной инфекции, либо к гетерологичным антигенам, доставляемым RASV [1].

Известно, что нуклеотидные последовательности *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* подобны приблизительно на 73%. Помимо этого, все три вида патогенных для человека иерсиний обладают плазми-

Для корреспонденции:

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0102

Статья поступила 02.04.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Alexandra S. Trunyakova, Junior Researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0112

The article was received 02.04.2025, accepted for publication 30.06.2025

дой кальцийзависимости pCad (pCD1/pYV), кодирующей систему секреции типа III (Т3SS) [2]. Два вида (*Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*) имеют более 90% генетической идентичности. Геном *Y. pseudotuberculosis* более стабилен, так как содержит меньше копий IS, и возбудитель псевдотуберкулеза имеет более широкий диапазон хозяев (грызуны, собаки, кошки, крупный рогатый скот, кролики, олени и люди) [3]. Живые аттенуированные рекомбинантные штаммы *Y. pseudotuberculosis* предлагается использовать в качестве оральных вакцин для специфической профилактики инфекций, вызванных патогенными иерсиниями, в т.ч. и *Y. pestis* [4]. Стимуляция адаптивного иммунитета слизистых оболочек ведет к защите от инфекции, начинающейся на поверхности слизистых [5], и, таким образом, потенциально может защитить от легочной чумы.

Для конструирования живых или векторных вакцин в качестве базового носителя обычно используют аттенуированные штаммы. С развитием современных методов стало возможным целенаправленно получать генетически модифицированные штаммы со сниженной вирулентностью, сохранившие высокую иммуногенность.

В настоящем обзоре обобщена информация об основных факторах патогенности псевдотуберкулезного микроба, перспективных для направленной аттенуации штаммов при создании безопасных живых и векторных вакцин для специфической профилактики инфекций, вызываемых иерсиниями.

Белки Yops

Y. pseudotuberculosis использует кодируемую плазмидой вирулентности pYV (~70 т.п.н.) систему секреции III типа (Т3SS) для доставки набора эффекторных белков, называемых Yops (*Yersinia* outer proteins), в клетки хозяина. Данные белки имеют высокую степень сходства последовательностей на уровне ДНК и аминокислот между патогенными представителями *Yersinia* spp. и, следовательно, схожие функции для каждого патогена [6]. Т3SS обнаружены у некоторых других грамотрицательных микроорганизмов, например *Salmonella enterica*, где также играют ключевую роль в патогенезе вызываемых инфекций [7]. Существуют два транслокаторных белка: YopB и YopD, а также семь эффекторных белков: YopJ (YopP в *Y. enterocolitica*), YopM, YopE, YopT, YopH, YpkA (YopO в *Y. enterocolitica*) и YopK (YopQ в *Y. enterocolitica*), вводимых в цитоплазму клеток хозяина, которые изменяют актиновый цитоскелет, ингибируют фагоцитоз, а также вызывают гибель клеток и подавляют провоспалительные реакции [8].

YopB, содержащий два трансмембранных домена, является основным компонентом поры транслокации, в то время как YopD и его гомологи, содержащие только один трансмембранный домен, обычно называются второстепенными транслокаторами. Успех инъекции Yops *Yersinia* для нейтрализации иммунного ответа хозяина зависит от правильно функционирующих YopB и YopD, взаимодействующих в олигомерном мембранном комплексе [9].

YopH – протеинтирозинфосфатаза, играющая ключевую роль в патогенезе инфекций, вызываемых патогенными *Yersinia* [10]. YopE активирует ГТФазную активность RhoA и Rac1, переводя их из активного состояния (связанного с ГТФ) в неактивное (связанное с ГДФ), что препятствует перестройке цитоскелета, необходимой для фагоцитоза [11].

Подобно YopE, YopT инактивирует Rho ГТФазы, но действует как цистеиновая протеаза, расщепляющая их С-концы и предотвращающая мембранное закрепление. Однако делеция *yopT* мало влияет на вирулентность штаммов *Y. pseudotuberculosis*, тогда как удаление *yopE* значительно ее ослабляет [12]. Аналогично, белок YopT оказался необязательным для вирулентности при моделировании чумной инфекции у мышей [13].

YpkA (*Yersinia* protein kinase) содержит два функциональных домена: серин/треониновой киназы (Ser/Thr) и ингибитора диссоциации гуаниновых нуклеотидов (GDI). Последний взаимодействует с Rho ГТФазами, подавляя фагоцитоз.

Помимо подавления фагоцитоза, Yops снижают продукцию цитокинов макрофагами. YopJ необходим *Yersinia* для ингибирования продукции фактора некроза опухоли- α (TNF- α) – ключевого провоспалительного цитокина секретируемого макрофагами в ответ на инфекцию. Кроме того, YopJ, YopE и YopT совместно подавляют выработку, созревание и секрецию интерлейкина-1 β (IL-1 β). Каталитическая активность YopT и YopE также ингибирует образование пор транслоконом Т3SS.

YopJ обладает ацетилтрансферазной активностью, ацетилируя остатки Ser и Thr, критически важные для активации митоген-активируемых киназ (MAP) и ингибитора κ B-киназы β . Это позволяет YopJ подавлять сигнальные пути MAP-киназ и NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – транскрипционный фактор), ингибируя выработку провоспалительных цитокинов. YopJ также необходим *Yersinia* для индукции апоптоза после инфицирования макрофагов. Грамотрицательные бактерии при развитии инфекции могут активировать как провоспалительные сигнальные пути макрофагов, так и апоптоз; например, активация Toll-подобного рецептора 4 может инициировать оба процесса [13]. Причем в зависимости от типа эукариотической клетки в ответ на YopJ происходит активация либо апоптоза, зависящего от каспазы-8, либо пироптоза за счет каспазы-8-зависимой активации каспазы-1 и высвобождение IL-1 β [14].

Не известна ферментативная активность YopM, и белок не имеет гомологов за пределами рода *Yersinia*, но играет ключевую роль в снижении активации инфламмосомы. Хотя утрата YopM оказывает лишь незначительное влияние на вирулентность, одновременная делеция *yopM* и *yopJ* приводит к синергическому ослаблению вирулентности патогена, что указывает на их координированное действие [15].

Утрата гена *yopM* снижает вирулентность штаммов *Y. pestis* при подкожном и внутривенном заражении мышей, но не оказывает существенного влияния на легочной модели инфекции. YopM-мутант *Y. pseudotuberculosis*, введенный внутривенно, демонстрирует снижение способности колонизации селезенки и легких по сравнению с штаммом «дикого» типа, тогда как пероральное введение не приводит к утрате штаммом способности приживаться во внутренних органах мышей [15].

Как и YopM, YopK не имеет гомологов за пределами рода *Yersinia*, но играет ключевую роль в патогенезе иерсиниозов и чумы. Делеция гена *yopK* приводит к феномену гипертранслокации – избыточной доставке эффекторных и транслокаторных Yops, что повышает цитотоксичность при инфицировании клеточных культур, однако *in vivo* это ведет к значительной аттенуации мутантного штамма [16].

Контроль экспрессии T3SS

Белок LcrV (V антиген), кодируемый расположенным на плазмиде pYV геном *lcrV*, изначально был описан как ключевой маркер вирулентности *Y. pestis*. LcrV выполняет несколько функций: регулирует продукцию Yops, участвует в TTSS-зависимой транслокации этих белков в клетки хозяина [17], а также служит для правильной сборки транслокационной поры YopB/YopD, но не является необходимым для вставки транслокаторов в мембраны клеток [18]. После формирования поры YopB/YopD белок LcrV высвобождается в окружающую среду. Кроме того, LcrV обладает иммуномодулирующими свойствами, подавляя выработку TNF- α и интерферона- γ и индуцируя IL-10 *in vivo* и *in vitro*. Критическая роль в иммуногенезе определяется тем, что белок LcrV в составе вакцинных препаратов эффективно защищает от различных форм иерсиниозной инфекции, включая чуму [19].

Система секреции VI типа (T6SS)

T6SS обычно состоит из 13 субъединиц, которые образуют структуру, аналогичную бактериофагу T4, посредством которой бактерии вводят эффекторный белок непосредственно в клетки-мишени. T6SS позволяет бактериям конкурировать с друг с другом либо атаковать простейших или высших эукариот. Показано, что делеция гена *vasK* T6SS ведет к значительному снижению вирулентности штамма *Y. pestis* CO92 на мышинной модели. Мутант с двойной делецией Δ уро2720-2733 Δ hcr3 показал 60%-е снижение вирулентности по сравнению с исходным штаммом *Y. pestis* CO92. Обычно аттенуированные штаммы с делецией генов, кодирующих компоненты T6SS, обладают более низкой цитотоксичностью и внутриклеточной выживаемостью в клетках хозяина *in vitro* по сравнению с исходными штаммами иерсиний. Мутанты *Y. pseudotuberculosis* YPIII, лишенные кластера генов T6SS-4 или гена *yezP*, авирулентны для мышей [20].

Система двойной транслокации аргинина

Развитие методов секвенирования геномов бактериальных патогенов значительно расширило возможности идентификации детерминант вирулентности и систем секреции [20]. Геномы близкородственных *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* содержат гомологи генов, кодирующих компоненты системы двойной аргининовой транслокации Tat (twin-arginine translocation), функционально аналогичной системе Tat *Escherichia coli* [4].

Путь Tat обеспечивает транспорт свернутых белков через внутреннюю мембрану грамотрицательных бактерий, распознавая их по N-концевому сигнальному пептиду с консенсус-мотивом S/TRRxFLK. M.Lavander et al. показали, что Tat-система необходима для подвижности и устойчивости к кислотному стрессу иерсиний. Делеция гена *tatC* в штамме *Y. pseudotuberculosis* не повлияла на рост *in vitro*, чувствительность к повышению осмолярности или температуры, окислительному стрессу, а также не нарушила секрецию компонентов TTSS. Тем не менее путь секреции Tat играет важную роль в патогенности *Y. pseudotuberculosis*, *tatC*-мутант демонстрировал значительное снижение вирулентности при оральном и внутрибрюшинном заражении мышей, а также нарушение колонизации пейеровых бляшек и селезенки [21].

Факторы адгезии

Ail (attachment invasion locus) – белок наружной мембраны, принадлежащий к семейству Ail/Lom, обнаруженный у патогенных *Yersinia*, *S. enterica* и *E. coli* [22]. Этот небольшой белок (17,6 кДа), кодируемый геном хромосомной локализации, является важным фактором патогенности *Yersinia*, обеспечивая устойчивость к сыворотке, адгезию, инвазию, а также способствуя доставке Yops в клетки-хозяева [23]. У всех трех патогенных для человека *Yersinia* Ail играет ключевую роль в устойчивости к сыворотке. Делеция *ail* делает *Y. pestis* практически полностью чувствительной к сыворотке человека и морской свинки [22]. Однако его активность может маскироваться О-полисахаридной цепью и олигосахаридами кора, как у *Y. enterocolitica* O:3 [24] или у *Y. pseudotuberculosis* YPIII [25]. Исследование *Y. pseudotuberculosis* IP32953 Δ ail показало, что белок критически важен для ранней колонизации легких и системного распространения [26].

YadA (*Yersinia adhesin*) – фактор патогенности *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, кодируемый плазмидой pYV [27]. У *Y. pestis* ген *yadA* присутствует, но не экспрессируется из-за мутации со сдвигом рамки считывания. Хотя белок YadA не является обязательным для вирулентности *Y. pseudotuberculosis*, он выполняет адгезивную и инвазивную функции, усиливая инвазию бактерий в клетки хозяина. YadA связывается с коллагенами, ламинином, фибронектином, а также с подслизистыми структурами кишечника и слизи, способствуя аутоагглютинации и агглютинирует эритроциты морской свинки. Кроме того, он ингибирует классический путь активации комплемента, обеспечивая устойчивость к сыворотке [28].

Антиген pH 6 (PsaA) присутствует у трех патогенных *Yersinia* [29]. Этот поверхностный гомополимер (15 кДа) синтезируется при pH 5,0–6,7 и температуре 35–41°C. По некоторым данным, белок PsaA важен для вирулентности *Y. pestis*, обеспечивая устойчивость к фагоцитозу, адгезию к альвеолярным клеткам легких, а также участвуя в термоиндуцибельной адгезии *Y. pseudotuberculosis* к эпителиальным клеткам Hep-2 и в гемагглютинации [30]. Однако в ряде штаммов *Y. pestis* его утрата не приводит к снижению вирулентности при подкожном заражении [31].

Инвазины

Y. pseudotuberculosis обладает множеством белков, обеспечивающих прочную адгезию к клеткам млекопитающих и успешную колонизацию тканей. Некоторые из них не только связываются с клетками, но и способствуют эффективной интернализации бактерий, что позволяет избегать иммунного ответа и проникать в глубокие ткани [32].

Наиболее полно охарактеризованным адгезином *Y. pseudotuberculosis* является инвазин (InvA), закрепленный на внешней мембране. Данный белок обеспечивает связывание и поглощение бактерий М-клетками, способствуя колонизации пейеровых бляшек, брыжеечных лимфатических узлов, печени и селезенки. InvA способствует прочному связыванию с β 1-интегринами на апикальной поверхности М-клеток, опосредуя начальную транслокацию через энтероциты [32].

Белки Ifr и InvC – автотранспортные белки, подобные InvA, также участвуют во взаимодействии с клетками

кишечника человека, мыши и свиньи. Гены *ifp* и *invC* экспрессируются *Y. pseudotuberculosis* в пейеровых бляшках, но не *in vitro*. В отличие от *InvC* белок *Ifp* играет значимую роль в вирулентности штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Показано, что *Ifp* участвует в формировании микроколоний и интернализации в поляризованные энтероциты. Ко-инфекция мышей смесью штаммов *Y. pseudotuberculosis* YPIII («дикий» тип) и YP97 (Δifp) ведет к значительному снижению колонизации пейеровых бляшек и брыжеечных лимфатических узлов, а также уменьшению распространения в печень и селезенку. Показано снижение проникновения и/или персистенции штаммов *Y. pseudotuberculosis*, дефектных по *Ifp* и *InvC*, в пейеровых бляшках, сопровождающееся увеличением количества профессиональных фагоцитов, особенно нейтрофилов, что подчеркивает роль белков в модулировании взаимодействия с иммунной системой хозяина [32].

ДНК-аденинметилаза

Инактивация гена *dam*, кодирующего ДНК-аденинметилазу, снижает вирулентность штаммов *S. enterica* serovar *Typhimurium*. Делеция гена *dam* является летальной мутацией для штамма *Y. pseudotuberculosis* YPIII, но его гиперэкспрессия приводит к аттенуации данного штамма [33]. Инактивация гена *dam* приводила к росту LD₅₀ штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 Δdam для мышей BALB/c при оральном или внутривенном введении в 10⁶ раз по сравнению LD₅₀ штамма дикого типа. Кроме того, мыши BALB/c после введения аттенуированного мутанта были защищены от подкожного заражения штаммом *Y. pestis* GB в дозе 100 LD₅₀ и внутривенного заражения штаммом *Y. pseudotuberculosis* IP32953 в дозе 300 LD₅₀ [34].

Шапероны

Белок SurA (Survival protein A) впервые был идентифицирован как фактор, способствующий выживанию *E. coli* в стационарной фазе роста [35]. Он обладает пептидил-пролил-изомеразной активностью благодаря парвулин-подобному домену белка [36], а его N-концевой домен выполняет функцию шаперона [37]. Установлено, что роль SurA в патогенезе инфекций связана с шаперонной активностью [38]. Делеция гена *surA* вызывает плейотропный эффект в клетках *Y. pseudotuberculosis*, что ведет к аттенуации штамма на мышиной модели инфекции [39]. Это может быть связано с его ролью в биогенезе наружной мембраны, а именно утратой белка *Inv* – ключевого фактора инвазии [39].

Заключение

Колонизация, последующее проникновение в эпителиальные слои, а также персистенция и пролиферация бактериальных патогенов в субэпителиальных тканях организма-хозяина требуют проявления специальных наборов факторов патогенности. Кроме того, для выживания и размножения в определенных нишах организма-хозяина бактериям необходимо адаптировать свой метаболизм. В течение жизненного цикла и на различных стадиях инфекции активация тех или иных метаболических функций в процессе адаптации отражает доступность пищевых ресурсов в окружающей среде, межбактериальную конкуренцию за источники

энергии и необходимость подавления бактерицидных реакций организма-хозяина.

В настоящем обзоре мы обсудили используемые к настоящему времени стратегии аттенуации иерсиний. Высокая степень гомологии патогенных *Yersinia* позволяет использовать штаммы *Y. pseudotuberculosis* для формирования перекрестного иммунитета и эффективной защиты как от чумы, так и от иерсиниозов.

Поиски оптимального способа аттенуации при конструировании вакцинных штаммов иерсиний продолжаются. Нокаут выбранного гена-мишени должен не только обеспечивать отсутствие остаточной вирулентности, но и сохранить высокую иммуногенность сконструированного штамма для лабораторных животных, используемых для оценки протективности вакцин. На наш взгляд, наиболее перспективными мишенями для создания иммунопрофилактических препаратов на основе штаммов *Y. pseudotuberculosis* являются Yops, адгезины и инвазины, белки внешней мембраны либо белки, отвечающие за биогенез внешней мембраны иерсиний.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Financial support

The work was carried out within the framework of the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Li Y, Wang S, Xin W, Scarpellini G, Shi Z, Gunn B, et al. A *sopB* deletion mutation enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines. *Infection and immunity*. 2008;76(11):5238–5246. DOI: 10.1128/IAI.00720-08
2. Cornelis GR. *Yersinia* type III secretion. *The J of Cell Biology*. 2002;158(3):401–408. DOI: 10.1083/jcb.200205077
3. Chain PSG, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(38):13826–13831. DOI: 10.1073/pnas.0404012101
4. Derbise A, Cerdà Marín A, Ave P, Blisnick T, Huerre M, Carniel E, et al. An Encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* Is a Highly Efficient Vaccine against Pneumonic Plague. *Small PLC, ed. PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1528. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001528
5. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005;11(S4):S45–S53. DOI: 10.1038/nm1213
6. Trosky JE, Liverman ADB, Orth K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol*. 2008;10(3):557–565. DOI:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x
7. Galán JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006;444(7119):567–573. DOI: 10.1038/nature05272
8. Pha K. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *WJBC*. 2016;7(1):1. DOI: 10.4331/wjbc.v7.i1.1
9. Costa TRD, Amer AAA, Farag SI, Wolf-Watz H, Fällman M, Fahlgren A, et al. Type III secretion translocon assemblies that attenuate *Yersinia* virulence: T3S translocon

- assembly intermediates of *Yersinia*. Cell Microbiol. 2013;15(7):1088-1110. DOI: 10.1111/cmi.12100
10. Cantwell AM, Bubeck SS, Dube PH. YopH inhibits early pro-inflammatory cytokine responses during plague pneumonia. BMC Immunol. 2010;11(1):29. DOI: 10.1186/1471-2172-11-29
11. Aepfelbacher M, Heesemann J. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). Int J Med Microbiol. 2001;291(4):269-276. DOI: 10.1078/1438-4221-00130
12. Viboud GI, Mejia E, Bliska JB. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. Cell Microbiol. 2006;8(9):1504-1515. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00729.x
13. Palace SG, Proulx MK, Szabady RL, Goguen JD. Gain-of-Function Analysis Reveals Important Virulence Roles for the *Yersinia pestis* Type III Secretion System Effectors YopJ, YopT, and YpkA. Roy CR, ed. Infect Immun. 2018;86(9):e00318-18. DOI: 10.1128/IAI.00318-18
14. Orning P, Weng D, Starheim K, Ratner D, Best Z, Lee B, et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. Science. 2018;362(6418):1064-1069. DOI: 10.1126/science.aau2818
15. Schoberle TJ, Chung LK, McPhee JB, Bogin B, Bliska JB. Uncovering an Important Role for YopJ in the Inhibition of Caspase-1 in Activated Macrophages and Promoting *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence. Roy CR, ed. Infect Immun. 2016;84(4):1062-1072. DOI: 10.1128/IAI.00843-15
16. Thorslund SE, Ermert D, Fahlgren A, Erttmann SF, Nilsson K, Hosseinzadeh A, et al. Role of YopK in *Yersinia pseudotuberculosis* Resistance against Polymorphonuclear Leukocyte Defense. Infect Immun. 2013;81(1):11-22. DOI: 10.1128/IAI.00650-12
17. Brubaker RR. Interleukin-10 and Inhibition of Innate Immunity to *Yersiniae*: Roles of Yops and LcrV (V Antigen). Infect Immun. 2003;71(7):3673-3681. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3673-3681.2003
18. Goure J, Broz P, Attree O, Cornelis GR, Attree I. Protective Anti-V Antibodies Inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* Translocon Assembly within Host Membranes. J Infect Dis. 2005;192(2):218-225. DOI: 10.1086/430932
19. Reithmeier-Rost D, Bierschenk S, Filippova N, Schröder-Braunstein J, Sing A. *Yersinia* V antigen induces both TLR homo- and heterotolerance in an IL-10-involving manner. Cellular Immunology. 2004;231(1-2):63-74. DOI: 10.1016/j.cellimm.2004.12.003
20. Yang X, Pan J, Wang Y, Shen X. Type VI Secretion Systems Present New Insights on Pathogenic *Yersinia*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:260. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00260
21. Lavander M, Forsberg Å, Bröms JE, Ericsson SK. Twin Arginine Translocation in *Yersinia*. Adv Exp Med Biol. Springer New York; 2007;258-267. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8_23
22. Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. Front Cell Inf Microbio. 2012;2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103
23. Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. Environmental Microbiology. 2008;10(6):1419-1432. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01554.x
24. Biedzka-Sarek M, Salmenlinna S, Gruber M, Lupas AN, Meri S, Skurnik M. Functional Mapping of YadA- and Ail-Mediated Binding of Human Factor H to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. Infect Immun. 2008;76(11):5016-5027. DOI: 10.1128/IAI.00314-08
25. Tsang TM, Wiese JS, Felek S, Kronshage M, Krukonis ES. Ail Proteins of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* Have Different Cell Binding and Invasion Activities. Neyrolles O, ed. PLoS ONE. 2013;8(12):e83621. DOI: 10.1371/journal.pone.0083621
26. Paczosa MK, Fisher ML, Maldonado-Arocho FJ, Mecsas J. *Yersinia pseudotuberculosis* uses Ail and YadA to circumvent neutrophils by directing Yop translocation during lung infection: *Yersinia* utilizes Ail and YadA to block killing by PMNs. Cell Microbiol. 2014;16(2):247-268. DOI: 10.1111/cmi.12219
27. Mühlenkamp M, Oberhettinger P, Leo JC, Linke D, Schütz MS. *Yersinia* adhesin A (YadA) – Beauty & beast. Int J Med Microbiol. 2015;305(2):252-258. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.12.008
28. Bliska JB, Brodsky IE, Mecsas J. Role of the *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Plasmid in Pathogen-Phagocyte Interactions in Mesenteric Lymph Nodes. EcoSal Plus. 2021;9(2):eESP-0014-2021. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0014-2021
29. Byvalov AA, Konyshev IV. *Yersinia pseudotuberculosis*-derived adhesins. Russian Journal of Infection and Immunity. 2019;9(3-4):437-448. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448
30. Pakharukova N, Roy S, Tuittila M, Rahman MM, Paavilainen S, Ingars AK, et al. Structural basis for Myf and Psa fimbriae-mediated tropism of pathogenic strains of *Yersinia* for host tissues. Molecular Microbiology. 2016;102(4):593-610. DOI: 10.1111/mmi.13481
31. Бахтеева ИВ, Дентовская СВ, Панферцев ЕА, Светоч ТЭ, Кравченко ТБ, Платонов МЕ, и др. Вирулентность для мышей pH6+ и pH6- штаммов *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;1(95):34-36. / Bakhteyeva IV, Dentovskaya SV, Panfertsev EA, Svetoch TE, Kravchenko TB, Platonov ME, et al. Virulence for mice of pH6+ and pH6- *Yersinia pestis* strains. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;1(95):34-36. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-34-36 (In Russian).
32. Pisano F, Kochut A, Uliczka F, Geyer R, Stolz T, Thiermann T, et al. *In Vivo*-Induced InvA-Like Autotransporters Ifp and InvC of *Yersinia pseudotuberculosis* Promote Interactions with Intestinal Epithelial Cells and Contribute to Virulence. Infect Immun. 2012;80(3):1050-1064. DOI: 10.1128/IAI.05715-11
33. Julio SM, Heithoff DM, Provenzano D, Klose KE, Sinsheimer RL, Low DA, et al. DNA Adenine Methylase Is Essential for Viability and Plays a Role in the Pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. O'Brien AD, ed. Infect Immun. 2001;69(12):7610-7615. DOI: 10.1128/IAI.69.12.7610-7615.2001
34. Taylor VL, Titball RW, Oyston PCF. Oral immunization with a dam mutant of *Yersinia pseudotuberculosis* protects against plague. Microbiology. 2005;151(6):1919-1926. DOI: 10.1099/mic.0.27959-0
35. Tormo A, Almiron M, Kolter R. *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. J Bacteriol. 1990;172(8):4339-4347. DOI: 10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990
36. Rouvière PE, Gross CA. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. Genes Dev. 1996;10(24):3170-3182. DOI: 10.1101/gad.10.24.3170
37. Behrens S. The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. The EMBO Journal. 2001;20(1):285-294. DOI: 10.1093/emboj/20.1.285
38. Behrens-Kneip S. The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. Int J Med Microbiol. 2010;300(7):421-428. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.012
39. Obi IR, Francis MS. Demarcating SurA Activities Required for Outer Membrane Targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* Adhesins. Infect Immun. 2013;81(7):2296-2308. DOI: 10.1128/IAI.01208-12

Информация о соавторах:

Вагайская Анастасия Сергеевна, научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

Anastasia S. Vagaiskaya, Researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Опыт реализации программы профессиональной переподготовки по специальности «медицинский микробиолог»

Е.А.Михайлова, Л.М.Азнабаева, О.О.Жеребятёва, Т.В.Чернышева

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, Российская Федерация

Современная система медицинского образования функционирует в условиях высоких темпов развития общества, происходит переход к интегрированному обучению, способствующему обеспечению преемственности знаний на различных этапах подготовки специалиста, взаимосвязи между фундаментальными и клиническими науками, интегрированию науки и практики. Принятие нового профессионального стандарта привело к кардинальным преобразованиям в сфере подготовки специалистов.

Авторами представлен опыт кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России по разработке и реализации дополнительной профессиональной программы профессиональной переподготовки «Медицинская микробиология» для подготовки врачей новой специальности.

Разработанная и реализуемая дополнительная профессиональная программа профессиональной переподготовки «Медицинская микробиология» отвечает основным требованиям приказа 384н Минтруда от 8 июня 2021 г. и обеспечивает формирование универсальных, профессиональных компетенций и подготовку врача – медицинского микробиолога. За период с 2023 по 2024 г. по данной программе обучились, успешно прошли аттестацию, получили диплом о профессиональной переподготовке и прошли первичную аккредитацию по специальности «медицинская микробиология» 9 специалистов.

Наличие новых заявок на обучение в 2025 г. подтверждает актуальность и определяет востребованность разработанной программы для системы здравоохранения России.

Ключевые слова: профессиональная переподготовка, профессиональный стандарт, медицинский микробиолог, компетенции, профессиональные навыки, трудовые функции

Для цитирования: Михайлова Е.А., Азнабаева Л.М., Жеребятёва О.О., Чернышева Т.В. Опыт реализации программы профессиональной переподготовки по специальности «медицинский микробиолог». Бактериология. 2025; 10(2): 108–112. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-108-112

Experience in implementing a program of professional retraining in the specialty of medical microbiology

E.A.Mikhailova, L.M.Aznabaeva, O.O.Zherebyateva, T.V.Chernysheva

Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russian Federation

The modern system of medical education operates within a context of rapid societal development. There is a transition to integrated training, which helps ensure knowledge continuity across various stages of specialist training, fosters the relationship between fundamental and clinical sciences, and integrates science and practice. The adoption of a new professional standard has led to radical changes in specialist training.

The authors present the experience of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Orenburg State Medical University" under the Ministry of Health of the Russian Federation in developing and implementing an additional professional retraining program titled "Medical Microbiology" for training doctors in this new specialty.

The developed and implemented "Medical Microbiology" retraining program meets the basic requirements of Order 384n of the Ministry of Labor dated June 08, 2021, and ensures the formation of universal and professional competencies, ultimately training doctors as medical microbiologists. Between 2023 and 2024, nine specialists were trained under this program. They successfully passed certification, received diplomas of professional retraining, and underwent primary accreditation in the specialty "Medical Microbiology."

Для корреспонденции:

Азнабаева Лилия Мидехатевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 460000, Оренбург, ул. Советская, 6
ORCID: 0000-0003-4028-5920

Статья поступила 28.01.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Lilia M. Aznabaeva, PhD, MD, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 6 Sovetskaya str., Orenburg, 460000, Russian Federation
ORCID: 0000-0003-4028-5920

The article was received 28.01.2025, accepted for publication 30.06.2025

New applications for training in 2025 confirms the relevance and highlights the demand for the developed program within the Russian healthcare system.

Key words: professional retraining, professional standard, medical microbiologist, competencies, professional skills, labor functions

For citation: Mikhailova E.A., Aznabaeva L.M., Zhrebeyateva O.O., Chernysheva T.V. Experience in implementing a program of professional retraining in the specialty of medical microbiology. Bacteriology. 2025; 10(2): 108–112. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-108-112

Современная система медицинского образования функционирует в условиях высоких темпов развития общества. Переход к многоуровневой системе медицинского образования обусловлен требованием высокого качества подготовки специалистов в быстро меняющихся условиях жизни. Происходит переход к интегрированному обучению, которое направлено на обеспечение взаимосвязи между фундаментальными и клиническими науками [1]. Современный процесс цифровизации в профессиональном образовании и обучении предоставляет обучающимся большие возможности, но в то же время вызывает определенные трудности и проблемы. По сравнению с предыдущими поколениями современное поколение молодых людей отличается новаторскими запросами к процессу обучения, выдвигает новые требования к методическому обеспечению учебных занятий, более адекватные их образовательному потенциалу [2]. Основная задача образования в современных условиях – формирование личности компетентного специалиста с инновационной направленностью, с психологической установкой на самосовершенствование.

Необходимость самосовершенствования – обязательное условие для специалиста в любой отрасли медицины. Причиной тому служит быстрый прогресс современной практико-ассоциированной науки, начиная от нормативно-правовой составляющей и заканчивая материально-технической базой каждого лечебного и диагностического учреждения [3, 4]. В ряде случаев, вследствие современных внешних причин и обстоятельств, необходима принципиальная коррекция некоторых направлений подготовки, инициированная на государственном уровне. Нужды практического здравоохранения в области подготовки специалистов микробиологов, в частности медицинских микробиологов, индуцировали появление нового профессионального стандарта «Специалист в области медицинской микробиологии». Принятие данного стандарта привело к серьезным преобразованиям в сфере подготовки специалистов [5].

Обобщенной трудовой функцией в стандарте является «Проведение микробиологических исследований (бактериологических, вирусологических, микологических и паразитологических)». Таким образом, стандарт объединяет несколько существующих ранее специальностей – «Бактериология», «Вирусология», «Лабораторная микология» и «Паразитология» – в одну с весьма обширными навыками и практическими умениями. В связи с этим возникла необходимость в кратчайшие сроки разработать, утвердить и реализовать программы профессиональной переподготовки врачей по специальности «медицинский микробиолог».

На основании приказа 384н Минтруда «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист в области медицинской микробиологии»» от 8 июня 2021 г. обучаться новой специальности могут лица, имеющие высшее образование –

специалитет по одной из специальностей: «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело», «Медицинская биохимия» (согласно приказу Минздрава России от 8 октября 2015 г. 707н, приказу Минздрава России от 10 февраля 2016 г. 83н), дополнительное профессиональное образование – программы профессиональной переподготовки по одной из специальностей: «Бактериология», «Вирусология», «Лабораторная микология», «Паразитология» при наличии подготовки в соответствии с квалификационными требованиями или высшее образование – специалитет по одной из специальностей: «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело», «Медицинская биохимия» и подготовка в интернатуре и/или ординатуре по одной из специальностей укрупненных групп специальностей: «Клиническая медицина» или «Науки о здоровье и профилактическая медицина» [6].

Программа предусматривает приобретение новой квалификации и связанных с ней новых компетенций и трудовых функций для выполнения нового вида профессиональной деятельности – деятельности в области медицинской микробиологии с целью осуществления микробиологических исследований для обеспечения медицинской помощи и санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Эти компетенции касаются традиционно выполняемых в лаборатории функций, таких как организация деятельности находящихся в подчинении медицинских работников, ведение необходимой документации, обеспечение биологической безопасности, оказание консультативной помощи медицинским работникам в планировании микробиологических исследований [7]. Формируемые компетенции позволят непосредственно проводить современные микробиологические исследования (включая молекулярно-биологические) для выявления возбудителей опасных и особо опасных инфекций, в т.ч. природно-очаговых, спонтанных и «возвращающихся». Большая часть этих компетенций будет сформирована на базе уже имеющихся у слушателей, так как исходный их уровень предусматривает достаточное знакомство с работой микробиологической либо паразитологической лаборатории, хотя на практике знания врачей-курсантов могут быть крайне узкоспециализированными в рамках одного-двух методов исследования. Особенностью новой программы является формирование актуальных в настоящее время компетенций для организации деятельности медицинской микробиологической лаборатории при чрезвычайных ситуациях, террористических актах и военных конфликтах.

Цель: обобщить опыт работы кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России (ОрГМУ) по разработке и реализации дополнительной профессиональной программы профессиональной переподготовки

товки «Медицинская микробиология» для подготовки врачей новой специальности.

Результаты исследования и их обсуждение

В 2021–2022 гг. на основании нормативно-правовых актов [6, 8–12] кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ОрГМУ была разработана и в августе 2022 г. утверждена и размещена на портале непрерывного фармацевтического и медицинского образования (НФМО) под регистрационным номером VPP0001434-2022 дополнительная профессиональная программа профессиональной подготовки «Медицинская микробиология» в объеме 576 ч (зачетных единиц).

Преподаватели, реализующие данную программу, имеют сертификат специалиста по специальности «Бактериология», стаж работы по специальности не менее 20 лет и, одновременно, свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Медицинская микробиология».

Структура программы включает 13 блоков, из которых 4 блока посвящены углубленному изучению фундаментальных разделов микробиологии (38 ЗЕТ (зачетная единица трудоемкости) и правовых основ медицинской деятельности (6 ЗЕТ), 8 блоков направлены на изучение медицинской бактериологии (70 ЗЕТ), медицинской вирусологии (66 ЗЕТ), медицинской микологии (86 ЗЕТ), медицинской паразитологии (86 ЗЕТ), клинической микробиологии (88 ЗЕТ), возбудителей природно-очаговых и особо опасных инфекций (16 ЗЕТ), санитарной микробиологии (60 ЗЕТ), 1 блок формирует навыки сердечно-легочной реанимации и оказания неотложной медицинской помощи (16 ЗЕТ).

Реализация программы осуществляется традиционными (лекция, практические занятия, стажировка на рабочем месте) и инновационными (работа с симуляционным материалом, составление алгоритмов проведения исследования различных клинических материалов, видеоконференции) методами.

Лекционный курс включает 82 лекции, при этом, в зависимости от потребностей обучающихся, есть возможность проведения лекций как в традиционном (аудиторном), так и в дистанционном формате (вебинары). Обучающиеся имеют возможность получить файлы с презентациями лекций для дополнительного самостоятельного обучения в рамках профессиональной переподготовки, а также им предоставляется право использовать материалы презентаций в своей дальнейшей работе – при подготовке сообщений для врачебных конференций, выступлений в рамках санитарно-просветительской работы с населением.

Практические занятия предполагают оценку теоретических знаний обучающихся. Для этого разработаны перечень вопросов для обсуждения, банк тестовых заданий, ситуационных задач. Оценка построения логических цепочек по организации работы, подготовке необходимых расходных материалов, объемов лабораторной посуды и задействованного оборудования, а также тайминга исследования осуществляется преподавателем в рамках практического занятия в устной и письменной форме. Умение излагать свои мысли в устной и письменной форме – один из навыков профессионального мышления и успешности специалиста –

формируется и закрепляется в процессе работы на практических занятиях. Преподаватель моделирует ситуационную задачу, а обучающиеся на основе ранее полученных знаний, пользуясь учебной, справочной и иной специальной литературой, составляют схему и алгоритм лабораторной диагностики пациента для конкретного нозологического заболевания. Подготовка кратких сообщений позволяет приобрести навыки работы со специальной литературой, обратить внимание на наиболее важные и сложные стороны рассматриваемого вопроса, продемонстрировать уровень владения материалом, логику изложения, культуру речи.

Одной из трудовых функций медицинского микробиолога является оказание консультативной помощи по вопросам микробиологических исследований, а в ряде случаев необходимостью является организация санитарно-противоэпидемических мероприятий, поэтому востребованными формами можно считать подготовку санитарно-просветительских бюллетеней и памяток по актуальным вопросам, ориентированных на различные социальные и возрастные группы населения. Изобилие доступных в настоящее время источников информации, к сожалению, не означает наличия у лиц, не относящихся к медицине, достаточно объективных знаний о некоторых заболеваниях микробной этиологии. Поэтому в рамках программы формируется и оценивается преподавателем умение выбрать основную важную информацию об инфекционном агенте, путях его распространения, необходимом минимуме исследований для его выявления, а также методах специфической и неспецифической профилактики соответствующего заболевания. Наряду с этим оценивается и умение представить данный материал разнообразно целевой аудитории, каковая может быть представлена детьми подготовительной группы дошкольного образовательного учреждения, работниками завода или магазина, а также и коллегами-врачами, которые являются едва ли не самым трудным контингентом для санитарно-просветительской работы в силу сформировавшейся системы медицинских представлений.

Задачей симуляционного обучения является формирование у обучающегося профессиональных компетенций, включающих знания, навыки, умения. Воссоздаются этапы проведения и отрабатываются навыки микробиологических исследований. Обучение проводится на базе микробиологической лаборатории научно-исследовательского центра ОрГМУ, которая имеет лицензию для работы с микроорганизмами II–IV группы патогенности (в т.ч. и COVID-19). Лабораторный класс в микробиологической лаборатории оснащен микроскопами (световыми, люминесцентным), наборами микропрепаратов, имеются муляжи, альбомы фотографий, учебные фильмы, воспроизводящие культуральные, биохимические, серологические, биологические, молекулярные методы диагностики. Также есть все необходимое оборудование, расходные материалы для освоения рутинных микробиологических навыков: сбора и транспортировки биологического материала, выделения на различных искусственных и живых средах основных возбудителей (бактерии, вирусы, грибы, простейшие и гельминты) и их биохимической, антигенной, молекулярно-биологической, газо-химической идентификации, определения фаготипа, чувствительности к антимикробным препаратам, интерпре-

тации полученных результатов. В рамках симуляционного курса обучающиеся имеют возможность получить или совершенствовать навыки проведения исследований методом полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа, приобрести опыт работы с роботизированным комплексом для автоматического выделения нуклеиновых кислот; навыки идентификации микроорганизмов по стандартизированным методикам MALDI-TOF MS на приборе Vitek MS (bioMérieux).

Совершенствование организационно-методических навыков происходит при работе с документацией, беседах с ведущим лабораторией, ознакомлении с особенностями закупок сред и реактивов, изучении каталогов фирм – производителей материалов для современной микробиологической лаборатории.

Важный этап получения новой специальности – стажировка. Задача стажировки – приобрести навыки выполнения микробиологических исследований. Стажировка осуществляется в соответствии с Приказом [12] и включает в себя: самостоятельную работу с учебными изданиями и материалами симуляционного курса; приобретение профессиональных и организаторских навыков; изучение организации и технологии работ; непосредственное участие в планировании работы организации; работу с технической, нормативной и другой документацией по специальности; выполнение функциональных обязанностей врача-микробиолога в качестве дублера.

Итоговая аттестация по программе проводится в виде экзамена и выявляет теоретическую и практическую подготовку обучающегося в соответствии с целями и содержанием программы. Экзаменационное тестирование включает в себя вариант тестовых заданий из 100 вопросов, который формируется автоматически информационной системой вуза из базы, содержащей 2500 вопросов. Этот этап проверки знаний позволяет в течение короткого времени проинспектировать весь пласт сформированных знаний, а не только выборочные вопросы, причем сделать это с высоким уровнем объективности. Следующие два этапа экзамена, реализуемые в виде собеседования и демонстрации практических навыков, позволяют оценить наличие теоретических знаний и практических навыков более высокого порядка. Экзаменационная карта для собеседования включает в себя два вопроса по теории (нормативно-правовая база, организация лаборатории, общая характеристика принципов и методов диагностики, правила забора различных образцов для исследования, транспортировки, хранения) и детальное описание одного из методов диагностики с разбором техники его исполнения. На этапе демонстрации сформированных навыков врачам-курсантам предлагается решить ситуационные кейс-задания. Такое задание включает в себя первичную информацию и 4 вопроса. Каждое задание укомплектовано дополнительными материалами, которые становятся доступны по мере ответов на предшествующие вопросы. Для оценки навыков есть необходимые имитационные материалы и муляжи, которые отвечающий должен самостоятельно выбрать для демонстрации своего ответа и объяснения последовательности своих действий при проведении исследования и интерпретации его результатов. Такая трехэтапная система итоговой аттестации позволяет наибо-

лее полноценно оценить результаты переподготовки специалиста.

В 2023 г. по данной программе в ФГБОУ ВО ОрГМУ обучались 5 специалистов, в 2024 г. – 4 специалиста. По окончании цикла профессиональной переподготовки все 9 человек успешно прошли аттестацию, получили диплом о профессиональной переподготовке, а 8 специалистов успешно прошли первичную специализированную аккредитацию по специальности «Медицинская микробиология», что дает право на продление лицензии на осуществление медицинской деятельности для медицинских учреждений, в которых работают эти специалисты. Для одного специалиста, в связи с рождением ребенка, аккредитация запланирована на июль 2025 г.

На обучение по дополнительной профессиональной программе профессиональной переподготовки «Медицинская микробиология» в 2025 г. через портал НФМО было подано 7 заявок от специалистов, что указывает на ее востребованность.

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. Москалев АВ, Сбойчаков ВБ, Карапац ММ, Гумилевский БЮ. В поисках совершенства: непрерывное медицинское образование и актуальные вопросы преподавания микробиологии. Вестник военного образования. 2019;5(20):53-57.
2. Природова ОФ, Данилова АН, Моргун АН. Структура цифровой образовательной среды: нормативно-правовые методические аспекты. Педагогика и психология образования. 2020;1:9-30. DOI: 10.31862/2500-297X-2020-1-9-30
3. Лазаренко ВА, Калущий ПВ, Дрёмова НБ, Овод АИ. Адаптация высшего медицинского образования к условиям цифровизации здравоохранения. Высшее образование в России. 2020;1:105-115. DOI: 10.31992/0869-3617-2020-29-1-105-115
4. Царёв ВН, Балмасова ИП, Маев ИВ, Мкртумян АМ, Арутюнов СД. Мотивационная готовность к междисциплинарной образовательной траектории в медицинские вузы России. Медицинское образование и профессиональное развитие. 2021;12(4):101-109. DOI: 10.33029/2220-8453-2021-12-4-101-109
5. Евдокимова ОВ, Бирюков ВВ, Котелевец ЕП. Профессиональные навыки и профиль специалиста в области медицинской микробиологии (обзор литературы). Личность в меняющемся мире: здоровье, адаптация, развитие. 2023;11(1(40)):59-71. DOI: 10.23888/humJ202311159-71
6. Профессиональный стандарт «Специалист в области медицинской микробиологии», рег. номер 1462, утвержденный приказом Минтруда России от 08 июня 2021 г. №384н.
7. Горельникова ЕА, Попов ЮА, Малюкова ТА, Чеховская ГВ, Шмелькова ТП, Сазанова ЕВ, и др. Реализация компетентного подхода при профессиональной переподготовке специалистов для работ с патогенными биологическими агентами I-II групп. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2022;11(2):120-128. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-2-120-128

8. Федеральный закон от 29 декабря 2012 г. №273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации», статья 76.
9. Федеральный закон от 30.03.1999 №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
10. Постановление Правительства Российской Федерации от 22 января 2013 г. №23 «О Правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов».
11. Приказ Минтруда России от 12 апреля 2013 г. №148н «Об утверждении уровней квалификаций в целях разработки проектов профессиональных стандартов».
12. Приказ Минобрнауки России от 01 июля 2013 г. №499 «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по дополнительным профессиональным программам».

References

1. Moskaev AV, Sboychakov VB, Carapac MM, Gumilevsky BYu. In search of perfection continuing medical education and topical issues of microbiology teaching. *Vestnik voennogo obrazovaniya*. 2019;5(20):53-57. (In Russian).
2. Prirodova OF, Danilova AV, Morgun AN. Digital educational environment structure: Regulatory legal and methodological aspects. *Pedagogy and Psychology of Education*. 2020;1:9-30. DOI: 10.31862/2500-297X-2020-1-9-30 (In Russian).
3. Lazarenko VA, Kalutsky PV, Dremova NB, Ovod AI. Adaptation of Higher Medical Education to the Conditions of Digitalization of Healthcare. *Higher Education in Russia*. 2020;29(1):105-115. DOI: 10.31992/0869-3617-2020-29-1-105-115 (In Russian).
4. Tsarev VN, Balmasova IP, Maev IV, Mkrtumyan AM, Arutyunov SD. Motivational readiness to implement an interdisciplinary educational trajectory to medical universities in Russia. *Medical Education and Professional Development*. 2021;12(4):101-110. DOI: 10.33029/2220-8453-2021-12-4-101-109 (In Russian).
5. Evdokimova OV, Biryukov VV, Kotelevets EP. Professional skills and profile of a specialist in the field of Medical Microbiology: literature review. *Personality in a Changing World: Health, Adaptation, Development*. 2023;11(1(40):59-71. DOI: 10.23888/humJ202311159-71 (In Russian).
6. Professional'nyi standart «Spetsialist v oblasti meditsinskoi mikrobiologii», reg. nomer 1462, utverzhdenyi prikazom Mintruda Rossii ot 08 iyunya 2021 g. №384n. (In Russian).
7. Gorelnikova EA, Popov YuA, Malyukova TA, Chekhovskaya GV, Shmelkova TP, Sazanova EV, et al. Competency-based approach implementation in professional retraining of specialists for work with biological agents of I–II pathogenicity groups. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2022;11(2):120-128. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-2-120-128 (In Russian).
8. Federal'nyi zakon ot 29 dekabrya 2012 g. №273-FZ «Ob obrazovanii v Rossiiskoi Federatsii», stat'ya 76. (In Russian).
9. Federal'nyi zakon ot 30.03.1999 №52-FZ «O sanitarno-epidemiologicheskom blagopoluchii naseleniya». (In Russian).
10. Postanovlenie Pravitel'stva Rossiiskoi Federatsii ot 22 yanvarya 2013 g. №23 «O Pravilakh razrabotki, utverzhdeniya i primeneniya professional'nykh standartov». (In Russian).
11. Prikaz Mintruda Rossii ot 12 aprelya 2013 g. №148n «Ob utverzhdenii urovnei kvalifikatsii v tselyakh razrabotki proektov professional'nykh standartov». (In Russian).
12. Prikaz Minobrnauki Rossii ot 01 iyulya 2013 g. №499 «Ob utverzhdenii Poryadka organizatsii i osushchestvleniya obrazovatel'noi deyatelnosti po dopolnitel'nym professional'nym programmam». (In Russian).

Информация о соавторах:

Михайлова Елена Алексеевна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России
ORCID: 0000-0003-1074-8963

Жеребятёва Ольга Олеговна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России
ORCID: 0000-0002-6751-3519

Чернышева Татьяна Викторовна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой внутренних болезней, проректор по учебной работе ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России
ORCID: 0000-0001-9645-5816

Information about co-authors:

Elena A. Mikhailova, PhD, DSc (Biological Sciences), Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation
ORCID: 0000-0003-1074-8963

Olga O. Zhrebeyateva, PhD, MD, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation
ORCID: 0000-0002-6751-3519

Tatiana V. Chernysheva, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Internal Diseases, Vice-Rector, Orenburg State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation
ORCID: 0000-0001-9645-5816

К 70-летию профессора Сейфаддина Гашимовича Марданлы

Сейфаддин Гашимович Марданлы, уроженец живописного Шарурского района Нахичеванской Автономной Республики Азербайджанской ССР, появился на свет 1 июня 1955 г. Там же, в родном краю, он завершил среднее образование, а в 1978 г., окрыленный мечтами о врачевании, окончил Азербайджанский государственный медицинский институт им. Н.Нариманова, получив специальность врача-эпидемиолога. Его первые шаги в профессии были связаны с работой в медицинских учреждениях Азербайджанской ССР, где он посвятил себя борьбе с распространением болезней.

В 1981 г. жажда знаний привела Сейфаддина Марданлы в аспирантуру прославленного НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи АМН СССР. В 1984 г., увенчав свои научные изыскания успехом, он защитил диссертацию и стал кандидатом медицинских наук. Новые горизонты открылись перед ним в подмосковном Электрогорске, где он трудился микробиологом и возглавлял цех по производству иммуноферментных диагностических тест-систем в НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, впоследствии преобразованном в инновационное предприятие «Антиген».

1991 г. стал поворотным в судьбе Сейфаддина Марданлы: он стоял у истоков создания АО «ЭКОлаб», компании, призванной разрабатывать и выпускать передовые диагностические наборы, лекарственные средства и биологически активные добавки. С 1994 г. и по сей день он является бессменным президентом этого предприятия. Под его чутким руководством «ЭКОлаб» стала одним из ведущих российских производителей медицинской продукции, чья палитра насчитывает более 500 наименований реагентов для диагностики грозных инфекций, таких как ВИЧ, вирусные гепатиты, сифилис, микоплазмозы, хламидиозы и многие другие. Компания также выпускает 50 наименований лекарственных средств, среди которых особое место занимают препараты на основе целебного растительного сырья и современные дженерики, а также 60 видов биологически активных добавок, включающих пробиотики, гепатопротекторы, витамины и необходимые микроэлементы.

Сейфаддин Гашимович Марданлы, доктор медицинских наук, чья диссертация «Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики» стала вехой в развитии отечественной медицины, сегодня является профессором кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин в



Государственном гуманитарно-технологическом университете. Его перу принадлежит более 400 научных трудов – от статей, искрящихся новизной мысли, до монографий и учебных пособий, коих насчитывается 15. С.Г.Марданлы – не только генератор знаний, но и их хранитель, он является главным редактором журнала «Известия ГГТУ» и членом редакционных коллегий авторитетных изданий «Эпидемиология и инфекционные болезни», «Бактериология» и «Клиническая лабораторная диагностика».

За преданное служение государству и науке Сейфаддин Гашимович отмечен высокими наградами: орденом «Звезда Вернадского» II степени, медалью «В память 850-летия Москвы», знаком «Отличнику здравоохранения». Он – лауреат премии им. А.Н.Косыгина за значительный вклад в экономику России и премии им. И.Н.Блохиной за выдающиеся достижения в медицинской биотехнологии, а также удостоен почетного звания «Заслуженный работник здравоохранения Российской Федерации».

Коллектив АО «ЭКОлаб» от всей души поздравляет Сейфаддина Гашимовича с юбилеем и желает ему неиссякаемой энергии, крепкого здоровья и долгих лет плодотворной работы на благо отечественной науки, промышленности и российского здравоохранения!

*Редакция журнала «Бактериология»,
коллектив Издательства «Династия» с радостью
присоединяются к этим теплым словам в адрес
члена редколлегии журнала и автора статей!*

К 85-летию профессора Эдуарда Арсеньевича Светоча

27 мая 2025 г. главному научному сотруднику Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, доктору ветеринарных наук, профессору Эдуарду Арсеньевичу Светочу исполнилось 85 лет.

Эдуард Арсеньевич родился в г. Зайсан Восточно-Казахстанской области Казахской ССР. После школы учился в Усть-Каменогорском сельскохозяйственном техникуме, по окончании работал зоотехником.

В 1965 г. Э.А.Светоч заканчивает Семипалатинский зооветеринарный институт по специальности «ветеринария» и непродолжительное время работает ветеринарным врачом на Шемонаихинской ветстанции.

1965–1969 гг. – учеба в аспирантуре Московской ветеринарной академии. Диссертационная работа Э.А.Светоча была посвящена изучению этиологической роли и факторам патогенности кишечной палочки при массовых желудочно-кишечных заболеваниях молодняка сельскохозяйственных животных. Во время учебы в аспирантуре он активно участвует в научных дискуссиях, отстаивая инфекционную природу массовых кишечных заболеваний молодняка в нашей стране. В 1969 г. Эдуард Арсеньевич возвращается в свой родной институт, где девять лет занимается педагогической и научной деятельностью сначала в должности ассистента, затем – доцента. В 1974 г. Эдуард Арсеньевич был назначен проректором по учебной работе, проработав в этой должности четыре года.

В 1978 г. Э.А.Светоч начинает работу во Всесоюзном научно-исследовательском институте прикладной микробиологии (ВНИИ ПМ) в должности старшего научного сотрудника отдела генетики, возглавляемого К.И.Волковым, а с декабря 1979 г. становится руководителем одной из лабораторий отдела. В 1984 г. Светоча Э.А. назначают руководителем отдела, впоследствии получившего название отдела молекулярной микробиологии. В этой должности он проработал 32 года. С 2016 г. Эдуард Арсеньевич является главным научным сотрудником отдела.

За время работы в институте под руководством Э.А.Светоча и при его непосредственном участии выполнены десятки научных тем, посвященных биологии, генетике, диагностике и методам лечения различных инфекций бактериальной природы. Особо следует отметить его вклад в изучение энтерогеморрагических шигатоксин-продуцирующих эшерихий. Под руководством Э.А.Светоча были инициированы и успешно продолжаются поиски и изучение бактериоцинов в качестве альтернативных средств подавления антибиотикорезистентных патогенов. В настоящее время Э.А.Светоч является ответственным исполнителем темы по разработке биотехнологической платформы получения вакцин на основе полисахаридных антигенов грамотрицатель-



ных бактерий в рамках федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья».

Под руководством профессора Светоча разработаны диагностические латексные тест-системы для идентификации 13 возбудителей бактериальных инфекций, пять из которых прошли государственную регистрацию.

При непосредственном участии Э.А.Светоча в отделе были организованы референс-лаборатории по изучению возбудителей легионеллеза, листериоза, клостридиозов, эшерихиозов и стафилококкозов.

За время работы в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) юбиляром опубликовано более 250 статей, получено более 20 патентов на изобретения. Под его руководством защищены 11 кандидатских и две докторских диссертации.

За вклад в развитие научных исследований, проводимых во ВНИИ ПМ/ГНЦ ПМБ, Светоч Э.А. награжден орденом «Знак Почета», медалью в честь 850-летия Москвы, Почетными грамотами Минздравсоцразвития и Председателя Правительства Российской Федерации, нагрудным знаком «Почетный работник Роспотребнадзора». Ему также присвоено звание Заслуженного деятеля науки Московской области.

Руководство и коллектив ГНЦ ПМБ желают нашему юбиляру здоровья и дальнейших творческих успехов в науке.

Редколлегия журнала «Бактериология», коллектив Издательства «Династия» поздравляют Эдуарда Арсеньевича со знаменательным юбилеем, желают ему крепкого здоровья, новых творческих достижений в науке и практической деятельности!

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