БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2026 • том 11 • №3

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно-практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

З.Адъясурэн, д.м.н., проф. (Монголия)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)
М.И.Буаро, д.м.н., проф. (Гвинейская Республика)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)
Ш.Гурбанов, к.м.н. (Азербайджанская Республика)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)
А.В.Карлышев, к.б.н., проф. (Великобритания)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)
М.Н.Косой, к.б.н. (США)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Республика Узбекистан)
С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.Л.Мотин, к.б.н., проф. (США)
В.В.Помазанов, д.т.н., проф. (Россия)
Т.В.Припутневич, член-корр. РАН, д.м.н. (Россия)
А.В.Ракин, к.м.н. (Германия)
Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
О.Е.Хохлова, д.б.н., доцент (Россия)
В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
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 является научным изданием, осуществляющим поддержку целей и задач Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов»
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 30.09.2026
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 1320 экз. Цена свободная.

Отдел рекламы:
Телефон: +7 495 660-6004
E-mail: reklama@phdynasty.ru

Подписной индекс по объединенному каталогу «Пресса России»: 39920

Бактериология
Научно-практический журнал
2026 • том 11 • №3

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

Иммунобиологические средства для предэкспозиционной профилактики и лечения сибирской язвы **5**

Экспериментальные статьи

IS-генотипирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*
А.Л.Трухачев, И.Н.Вострова, А.С.Водопьянов, М.Г.Мелоян, Е.А.Воскресенская, М.В.Чеснокова, В.Т.Климов, Г.И.Кокорина, Е.А.Богумильчик, Р.В.Писанов, С.Ю.Темякова, А.А.Ковалевич, В.А.Рыкова, О.Н.Подладчикова **8**

Высокомолекулярный гликоконъюгат нативного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b с белком-носителем CRM197: получение, физико-химическая и иммунологическая характеристика
П.А.Стряхнин, П.Г.Апарин, С.В.Коробова, И.Ю.Курбатова, Б.И.Алхазова, В.А.Ледов **19**

Сравнительный анализ биохимической активности природных и клинических штаммов микромицетов рода *Fusarium*
П.Е.Гуляев, С.А.Лисовская, Г.Ш.Исаева **26**

Сравнительная оценка токсичности и иммуногенности панели рекомбинантных белков бруцелл *in vivo*
В.И.Дятлова, Т.В.Гапельченкова, В.А.Казаков, С.В.Дентовская **31**

Воздействие литического фага Ph_15 на биопленки фагоустойчивых вариантов *Pseudomonas aeruginosa*
В.В.Кузин, О.А.Щербакова, Н.В.Колупаева, Е.С.Кузина, Л.В.Колупаева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, Р.Н.Перчиков, Е.В.Детушева **39**

Скрининг и оптимизация парных комбинаций моноклональных антител для иммунодетекции ботулинического нейротоксина серотипа B
Т.А.Иващенко, А.С.Карцева, А.К.Рябко, Н.А.Зенинская, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, Я.О.Романенко, И.С.Лутчева, А.А.Ершова, В.В.Фирстова **49**

Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Shigella flexneri* ST245 2a, вызвавшего вспышку дизентерии у пациентов дома престарелых
В.И.Соломенцев, Л.А.Шишкина, А.Ю.Лебедева, Т.Н.Мухина, К.В.Детушев, Д.В.Волков, А.А.Сизова, И.П.Мицевич, М.Г.Теймуразов, М.А.Евсеева, Н.Н.Карцев, М.В.Фурсов, И.А.Дятлов **58**

Разработка латексного иммунохроматографического теста для экспресс-выявления холерного токсина
А.Г.Королёва-Ушакова, Е.В.Баранова, А.Г.Шевяков, В.А.Яковлева, Е.А.Панфёрцев, Т.В.Решетняк, А.А.Баранова, А.Г.Волошин, А.А.Горбатов, С.Ф.Бикетов **68**

Апробация тест-системы для диагностики малярии на основе метода петлевой изотермической амплификации на клиническом материале
И.Ю.Щит, Морис Лама, Мамаду Бундухура Бах, А.А.Болтунова, А.А.Горбатов, Мохамед Сахар Траоре, Е.В.Найдёнова, С.Ф.Бикетов **75**

Контактно-сорбционное обезвоживание при подготовке культур бактериальных клеток к консервации
А.Н.Сомов, И.А.Дунайцев, Н.А.Шишкова, М.В.Клыкова, В.П.Левчук, Н.Ю.Буданова, И.А.Чукина, М.В.Храмов **82**

Разработка способа детекции *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale* на основе LAMP-CRISPR-Cas
И.Ю.Щит, Е.А.Панфёрцев, Т.В.Решетняк, С.Ф.Бикетов **89**

Обзоры

Влияние экологических стрессов на композиционный состав экзосом (внеклеточных везикул) микроорганизмов
Е.С.Шипко, О.В.Дуванова **93**

Возбудители газовой гангрены как раневой инфекции, факторы патогенности, угроза биологической безопасности и стратегии разработки вакцинных препаратов
Ю.О.Гончарова, В.С.Тимофеев, И.А.Дятлов **107**

Пути совершенствования диагностики возбудителя туляремии
Т.Ю.Кудрявцева, А.Н.Мокриевич, Г.М.Титарева, А.А.Горбатов **122**

Коклюш. Молекулярные особенности, эпидемиология и профилактика
Е.М.Глухая, О.Ю.Богданова, Т.Ф.Черных, О.М.Тихомирова **132**

Краткое сообщение

Геномы штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов нейрореанимации в Москве в 2012–2021 гг.
М.В.Фурсов, Т.С.Новикова, А.Е.Соломенцева, Д.В.Волков, О.О.Доброхотский, О.Н.Ершова, Н.К.Фурсова **140**

Геномные последовательности 125 клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Республике Беларусь в 2016–2025 гг.
А.Е.Соломенцева, Е.В.Карпова, С.В.Губанов, Д.В.Волков, А.А.Кисличкина, Л.А.Шишкина, Н.К.Фурсова, Д.В.Тапальский, М.В.Фурсов **147**

Скрининг спорообразующих бактерий, активных против антимикотикорезистентных грибов рода *Candida*
И.А.Дунайцев, С.К.Жиглецова, М.В.Клыкова, Т.А.Калмантаев, П.В.Слукин, Н.К.Фурсова **151**

Правила оформления статей (основные положения) **154**

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

The journal supports the aims and objectives of the National Scientific and Practical Society of Bacteriologists
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

Bacteriology
Scientific and Practical Journal
2026 • volume 11 • No 3

CONTENTS

Editor-in-Chief's Introduction

Immunobiological agents for pre-exposure prophylaxis and treatment of anthrax **5**

Experimental Articles

IS-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* strains
A.L.Trukhachev, I.N.Vostrova, A.S.Vodopyanov, M.G.Meloyan, E.A.Voskresenskaya, M.V.Chesnokova, V.T.Klimov, G.I.Kokorina, E.A.Bogumilchik, R.V.Pisanov, S.Yu.Temyakova, A.A.Kovalevich, V.A.Rykova, O.N.Podladchikova **8**

High-molecular-weight glycoconjugate of *Haemophilus influenzae* type b native polysaccharide with CRM197 carrier protein: preparation and physicochemical and immunological characterization
P.A.Stryakhnin, P.G.Aparin, S.V.Korobova, I.Yu.Kurbatova, B.I.Alkhazova, V.A.Ledov **19**

Comparative analysis of the biochemical activity of natural and clinical strains of micromycetes of the genus *Fusarium*
P.E.Gulyaev, S.A.Lisovskaya, G.S.Isaeva **26**

Comparative in vivo evaluation of toxicity and immunogenicity of a panel of recombinant brucella proteins
V.I.Dyatlova, T.V.Gapelchenkova, V.A.Kazakov, S.V.Dentovskaya **31**

Effect of lytic phage Ph_15 on the polysaccharide matrix of *Pseudomonas aeruginosa* mutants resistant to it
V.V.Kuzin, O.A.Shcherbakova, N.V.Kolupaeva, E.S.Kuzina, L.V.Kolupaeva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, R.N.Perchikov, E.V.Detusheva **39**

Screening and optimization of paired monoclonal antibody combinations for immunodetection of botulinum neurotoxin serotype B
T.A.Ivashchenko, A.S.Kartseva, A.K.Riabko, N.A.Zeninskaya, M.A.Marin, M.M.Rogozin, Ya.O.Romanenko, I.S.Lutcheva, A.A.Ershova, V.V.Firstova **49**

Molecular genetic characterization of *Shigella flexneri* strain ST245 2a caused an outbreak of dysentery in nursing home patients
V.I.Solomentsev, L.A.Shishkina, A.Yu.Lebedeva, T.N.Mukhina, K.V.Detushev, D.V.Volkov, A.A.Sizova, I.P.Mitsevich, M.G.Teimurazov, M.A.Evseeva, N.N.Kartsev, M.V.Fursov, I.A.Dyatlov **58**

Development of a latex immunochromatographic test for the rapid detection of cholera toxin
A.G.Korolyova-Ushakova, E.V.Baranova, A.G.Shevyakov, V.A.Yakovleva, E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, A.A.Baranova, A.G.Voloshin, A.A.Gorbatov, S.F.Biketov **68**

Validation of a loop-mediated isothermal amplification-based test system for malaria diagnosis using clinical specimens
I.Yu.Shchit, Maurice Lama, Mamadou Boundoukhoura Bah, A.A.Boltunova, A.A.Gorbatov, Mamed Zaar Traoré, E.V.Naidenova, S.F.Biketov **75**

Contact-sorption dehydration in the preparation of bacterial cell cultures for preservation
A.N.Somov, I.A.Dunaytsev, N.A.Shishkova, M.V.Klykova, V.P.Levchuk, N.Yu.Budanova, I.A.Chukina, M.V.Khramov **82**

A LAMP-CRISPR-Cas-based assay for the detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale*
I.Yu.Shchit, E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, S.F.Biketov **89**

Reviews

Influence of environmental stresses on the composition of exosomes (extracellular vesicles) of microorganisms
E.S.Shipko, O.V.Duvanova **93**

Causative agents of gas gangrene as a wound infection, pathogenicity factors, threat to biological safety, and strategies for the development of vaccine preparations
Yu.O.Goncharova, V.S.Timofeev, I.A.Dyatlov **107**

Ways to improve the diagnosis of the tularemia pathogen
T.Yu.Kudryavtseva, A.N.Mokrievich, G.M.Titareva, A.A.Gorbatov **122**

Whooping cough. Molecular features, epidemiology and prevention
E.M.Glukhaya, O.Yu.Bogdanova, T.F.Chernykh, O.M.Tikhomirova **132**

Brief messages

Genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients of neuro-ICU in Moscow in 2012–2021
M.V.Fursov, T.S.Novikova, A.E.Solomentseva, D.V.Volkov, O.N.Ershova, N.K.Fursova **140**

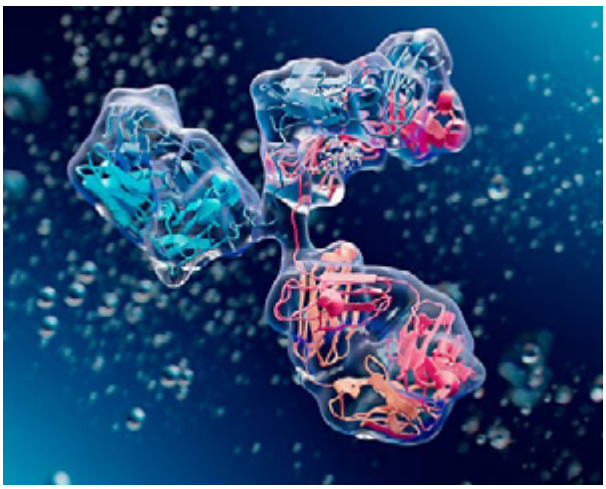
Whole-genome sequences of 125 clinical *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Belarus between 2016 and 2025
A.E.Solomentseva, E.V.Karpova, S.V.Gubanov, D.V.Volkov, A.A.Kislichkina, L.A.Shishkina, N.K.Fursova, D.V.Tapalsky, M.V.Fursov **147**

Screening for spore-forming bacteria active against antibiotic-resistant fungi of the genus *Candida*
I.A.Dunaytsev, S.K.Zhigletsova, M.V.Klykova, T.A.Kalmantaev, P.V.Slukin, N.K.Fursova **151**

Instructions for Authors **154**

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 5–7
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 5–7

Иммунобиологические средства для предэкспозиционной профилактики и лечения сибирской язвы



При лечении сибиреязвенной инфекции одним из важнейших элементов является нейтрализация токсина, выделяемого возбудителем в организме человека и являющегося основным фактором его патогенности. Для данной цели используются специфические антитела (нативные, моноклональные (МКА)) или их активные фрагменты.

Первое время, в начале пути развития иммунотерапии при сибирской язве, использовали гетерологичную сибиреязвенную сыворотку, которая нейтрализовала у морских свинок отечный фактор токсина и предотвращала гибель инфицированных обезьян. В медицинской практике использование сыворотки позволило резко снизить летальность при сибирской язве: с 50 до 3% при введении внутримышечно или внутривенно до 200–500 см^3 за один раз, повторяя через 1–2 дня до клинического улучшения состояния больных. Существенным недостатком использования сыворотки в качестве специфической терапии является сопутствующая сенсибилизация организма людей балластными сывороточными белками лошади, что может приводить к анафилактическому шоку. У лиц, ранее сенсибилизированных к этим белкам, нередко проявлялись аллергические реакции, иногда с очень тяжелой картиной анафилаксии. Поэтому с 1961 г. лечебную сыворотку в медицинской практике заменили противосибиреязвенным иммуноглобулином, используемым для серотерапии и серопрофилактики сибирской язвы.

Препарат иммуноглобулина представляет собой 10%-й раствор иммунологически наиболее активных белковых γ- и β-глобулиновых фракций, выделенных из сыворотки крови лошадей, иммунизированных вакцинным штаммом СТИ-1, авирулентным штаммом Ихтиман и специфическим токсином. С лечебной целью глобулин вводится внутримышечно немедленно по установлению диагноза, обычно в сочетании с антибиотиками, ежесуточно в количестве 30–50 см^3 при среднетяжелом и тяжелом течении болезни, а при крайне тяжелом течении и сепсисе – 75–100 см^3 в течение первых 3–4 суток болезни. При легком течении болезни глобулинотерапия не используется.

В развитие данного направления американские исследователи разработали новый препарат для лечения сибирской язвы – иммуноглобулин, получаемый из сыворотки крови людей, привитых против сибирской язвы. Иммуноглобулины получены из крови 75 американских солдат, иммунизированных вакциной AVA. При биотеррористическом эксцессе 2001 г. в США одному из больных с диагнозом «сибирская язва, легочная форма, тяжелое течение» одновременно с ципрофлоксацином вводили человеческий сибиреязвенный иммуноглобулин, проводили искусственную вентиляцию легких, дренирование плевральной полости с аспирацией плевральной жидкости. Несмотря на крайне тяжелое течение заболевания, своевременно начатая интенсивная терапия позволила спасти больному жизнь.

Противосибиреязвенный иммуноглобулин, как и другие гетерогенные сывороточные препараты, обладает сенсибилизирующими свойствами и способен вызывать у людей тяжелые анафилактические реакции. Так, из 29 человек у 7 после введения глобулина наблюдали реакцию в виде резко зудящей сыпи типа крапивницы, а также незначительной болезненности регионарных лимфатических узлов. Двое были госпитализированы с жалобами на слабость, головокружение, повышение температуры тела. Кроме того, сыворотка или иммуноглобулин не всегда оказывали лечебное

действие, особенно при позднем введении на стадии выраженной токсемии, а иногда даже ускоряли летальный исход. Поэтому лошадиный поливалентный иммуноглобулин против сибирской язвы применять у людей небезопасно. При анализе большого клинического материала отрицательное действие иммуноглобулина при лечении заметил крупный российский эпидемиолог Б.Л.Черкасский, рекомендовавший воздержаться от его использования.

В ГНЦ ПМБ была проведена большая научно-исследовательская работа в направлении оценки отрицательного действия иммуноглобулина из сыворотки крови лошади на организм лабораторных животных. Было показано, что антитела к III домену протективного антигена возбудителя, присутствующие в иммуноглобулине, усиливают действие летального фактора, с чем и связано его отрицательное действие. Как было установлено, механизм потенцирования действия летального токсина МКА 1F2 и 1D6 (получены направленно к эпитопам III домена) состоит в Fc-рецепторном усилении эндоцитоза комплекса летального токсина в чувствительную клетку-мишень.

По-видимому, в разных сериях лошадиного иммуноглобулина присутствует разное количество таких «вредных» антител и их отрицательное действие при лечении проявляется в разной степени, а стандартизация по данному показателю препарата не проводится.

В связи с этим постоянно ведется поиск новых специфических лечебных иммунобиологических лекарственных средств, безвредных и высокоэффективных при использовании на стадии токсемии сибиреязвенной инфекции.

В этом направлении в свое время в ГНЦ ПМБ был разработан метод получения укороченных противосибиреязвенных антител из сыворотки крови гипериммунизированных кроликов и из коммерческого противосибиреязвенного иммуноглобулина. Путем контролируемого расщепления IgG пепсином и гель-фильтрации на сефадексе были выделены F(ab`)2-фрагменты антител, которые обладали в реакции диффузионной преципитации иммунохимической активностью по отношению к токсину. При испытаниях в острых опытах по заражению выжило 90% животных при гибели всех контрольных, что свидетельствует о высокой эффективности препарата, примененного на стадии развитой токсемии.

В НИИ микробиологии МО РФ были отработаны параметры технологического процесса лабораторного получения из коммерческого противосибиреязвенного иммуноглобулина очищенного препарата F(ab`)2-фрагмента. Эффективность этого препарата в сравнении с противосибиреязвенным иммуноглобулином была оценена в экспериментах на кроликах, зараженных подкожно вирулентным штаммом в дозе 100 LD_{50}. Оказалось, что при разных способах введения эффективность препарата была в два и более раза выше, чем у глобулина. При этом эффект обеспечивался в дозе, более чем на порядок меньшей, чем у иммуноглобулина. Высокая эффективность препарата при лечении генерализованной формы сибирской язвы была установлена в экспериментах на кроликах и обезьянах павианах гамадрилах в случаях применения препарата F(ab`)2-фрагмента в сочетании с доксициклином. Таким образом, при лечении разных форм сибирской язвы, вызванной в т.ч. антибиотикорезистентными вариантами возбудителя, наряду с антибиотиками резерва в острой фазе токсемии могут быть использованы препараты на основе F(ab`)2-фрагментов.

Недостатком таких фрагментов антител является их короткое время пребывания в организме, что делает практически невозможным использование для предэкспозиционной профилактики, когда есть опасность заражения сибирской язвой. Кроме того, при получении F(ab`)2-фрагментов из сыворотки иммунизированных людей или коммерческого иммуноглобулина препарат будет содержать большое количество таких фрагментов к различным антигенам возбудителя сибирской язвы, а не только к токсину, что для терапии не очень обосновано в силу описанного выше эффекта влияния некоторых антител на усиление действия токсина.

В России был получен противосибиреязвенный иммуноглобулин человека для внутривенного введения и изучены его иммунохимические и протективные свойства. Иммунную плазму заготавливали от доноров, вакцинированных комбинированной сибиреязвенной вакциной. Эффективность применения иммуноглобулина была изучена на базе ГНЦ ПМБ. Препарат защищал от гибели 10% белых мышей, 50% морских свинок и 80% кроликов. Иммуноглобулин является гомологичным для человеческого организма, не токсичен, не пирогенен и по основным параметрам соответствует требованиям, предъявляемым к внутривенным препаратам. Такой препарат может быть полезен, однако его получение в больших количествах для формирования запаса представляется сложной задачей в связи с проблемой с донорами.

Различные виды специфических МКА, химерных, германизированных или полностью человеческих, проявляют существенную эффективность при нейтрализации токсина в организме, так как препятствуют самосборке компонентов этого белка в токсический комплекс. Кроме того, они лишены многих недостатков, присущих другим иммунопрепаратам: долго циркулируют в крови, не вызы-

вают сенсибилизации и анафилаксии, обладают в ряде случаев антимикробным действием, хорошо переносятся при лечении.

Эффективным барьером на ранних стадиях сибиреязвенной инфекции являются антитела к поверхностным антигенам спор. Это было подтверждено на мышиной модели с использованием МКА к спорам *Bacillus anthracis*, когда МКА предотвращали прорастание спор в вегетативные клетки in vitro, усиливали фагоцитоз спор и гибель вегетативных клеток в макрофагах, что привело к 90%-й выживаемости мышей, инфицированных штаммом *B. anthracis* Ames. Эти наблюдения позволили предположить, что иммунный ответ, возникающий в результате такой вакцинации, способен предотвратить летальную интоксикацию, а также бороться с сибиреязвенной инфекцией уже на начальном этапе заражения возбудителем.

В ГНЦ ПМБ в течение многих лет ведется работа по получению МКА к значимым антигенам возбудителя сибирской язвы. Были получены мышиные МКА к вегетативным клеткам и спорам, использованные для конструирования диагностических систем в форматах иммунохроматографических тестов, иммуноферментных тест-систем, иммуно-ПЦР-тест-систем. Такие системы зарегистрированы, но на постоянной основе выпускаются только наиболее востребованные быстрые иммунохроматографические тесты.

Наиболее значимым результатом наших исследований явилась разработка терапевтических МКА для купирования токсических состояний при сибиреязвенной инфекции у людей. Эти МКА можно производить при культивировании штаммов-продуцентов и создавать стабильные лекарственные формы.

При разработке основу составляли сведения о иммунохимических особенностях протективного антигена (PA) возбудителя сибирской язвы. У *B. anthracis* присутствуют бинарные токсины, состоящие из субъединиц A и B. Субъединица A обладает ферментативной активностью, содержит летальный фактор (LF) и отечный фактор (EF), субъединица B выполняет функции связывания с рецепторами и формирования пор. В результате взаимодействия LF с PA образуется летальный токсин, а при связывании EF с PA – отечный токсин. Наиболее значимым в патогенезе является летальный токсин.

В результате длительных молекулярно-генетических исследований и генно-инженерных разработок в ГНЦ ПМБ было создано химерное МКА xi1E10, специфически взаимодействующее с протективным антигеном и способное нейтрализовать летальный токсин. Токсиннейтрализующая активность МКА xi1E10 в дозе 100 мкг/мышь (в/в) приводила к 100%-й выживаемости при внутрибрюшинном введении 4 LD_{50} летального токсина. Это очень хороший практический результат.

Была дана полная характеристика МКА xi1E10: определение класса антитела (IgG1), специфичности (IV домен PA), аффинность связывания с PA ($KDxi1E10 = 1{,}2663 \cdot 10^{-9}$ M), длительности циркуляции МКА (не менее 28 дней) и токсиннейтрализующей активности. Кроме того, разработана реакторная технология получения данного продукта в необходимых для создания лекарственного средства количествах.

При определении механизма нейтрализации летального токсина МКА xi1E10 было показано, что летальный токсин без добавления антитела проникает внутрь клетки, а с добавлением антитела – нет. Также был показан процесс деградации молекул летального токсина, связавшихся с МКА xi1E10, в лизосомах.

Таким образом, создание препаратов для предэкспозиционной профилактики и лечения сибирской язвы на основе различных типов антител и их фрагментов находится в постоянном развитии и идет по пути разработки эффективных и безопасных средств. Для обеспечения биологической безопасности следует проводить дальнейшие исследования и разработки для создания препаратов и технологий их производства, отвечающих современным требованиям к иммунобиологическим лекарственным средства такого уровня.

Главный редактор, академик РАН И.А.Дятлов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 8–18
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 8–18

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-8-18

IS-генотипирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*

А.Л.Трухачев[1], И.Н.Вострова[1], А.С.Водопьянов[1], М.Г.Мелоян[1], Е.А.Воскресенская[2], М.В.Чеснокова[3], В.Т.Климов[4], Г.И.Кокорина[2], Е.А.Богумильчик[2], Р.В.Писанов[1], С.Ю.Темякова[1], А.А.Ковалевич[1], В.А.Рыкова[1], О.Н.Подладчикова[1]

[1]ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;
[2]ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Российская Федерация;
[3]ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;
[4]ФКУЗ «Иркутский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Возбудитель псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis* является микроорганизмом, способным вызывать тяжелое инфекционное заболевание у людей. При выделении штаммов возбудителя псевдотуберкулеза из клинического материала или из объектов окружающей среды возникает необходимость определения их генотипа. Расширение спектра методов генотипирования штаммов позволяет наиболее полно оценить генетическое разнообразие *Y. pseudotuberculosis* и эффективно использовать эти данные при проведении эпидемиологического анализа. В настоящем исследовании в качестве специфических мишеней для дифференциации разных групп штаммов возбудителя псевдотуберкулеза мы использовали данные о локализации в геномах пяти IS-элементов (IS100, IS285, IS1541, IS1617, IS630). Целью работы стала разработка способа IS-генотипирования *Y. pseudotuberculosis* в полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in vitro* и *in silico* и анализ с помощью этого метода штаммов, выделенных в разные годы на территории России. Для IS-генотипирования *Y. pseudotuberculosis* был разработан набор праймеров, выявляющих в геномах различных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза 13 IS-маркеров. Результаты ПЦР при использовании этих праймеров и ДНК 360 штаммов *Y. pseudotuberculosis* позволили разделить все штаммы на 76 генетических групп (IS-генотипов). При этом российские штаммы попали в семь геногрупп (IS2, IS3, IS4, IS5, IS9, IS10, IS13), четыре из которых (IS2, IS3, IS5, IS10) также включали штаммы, выделенные по всему миру, а группы IS4, IS9 и IS13 состояли только из российских штаммов. Предложенный способ IS-генотипирования, обладающий высоким дискриминационным потенциалом (индекс Симпсона 0,921), может быть использован в комплексе с уже известными методами генотипирования *Y. pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: Yersinia pseudotuberculosis, возбудитель псевдотуберкулеза, генотипирование, IS-элементы, IS-генотипирование, генетическое разнообразие

Для цитирования: Трухачев А.Л., Вострова И.Н., Водопьянов А.С., Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А., Писанов Р.В., Темякова С.Ю., Ковалевич А.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. IS-генотипирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Бактериология. 2026; 11(3): 8–18. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-8-18

IS-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* strains

A.L.Trukhachev[1], I.N.Vostrova[1], A.S.Vodopyanov[1], M.G.Meloyan[1], E.A.Voskresenskaya[2], M.V.Chesnokova[3], V.T.Klimov[4], G.I.Kokorina[2], E.A.Bogumilchik[2], R.V.Pisanov[1], S.Yu.Temyakova[1], A.A.Kovalevich[1], V.A.Rykova[1], O.N.Podladchikova[1]

[1]Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
[2]Pasteur Saint Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Saint Petersburg, Russian Federation;
[3]Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation;
[4]Irkutsk Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Для корреспонденции:

Трухачев Алексей Леонидович, 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. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9113
E-mail: trukhachev_al@antiplague.ru
ORCID: 0000-0002-3531-1146

For correspondence:

Aleksey L. Trukhachev, MD, PhD, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 Maxim Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9113
E-mail: trukhachev_al@antiplague.ru

Статья поступила 06.03.2026, принята к печати 30.09.2026

The article was received 06.03.2026, accepted for publication 30.09.2026

The causative agent of pseudotuberculosis, *Yersinia pseudotuberculosis*, is a microorganism capable of causing severe infectious disease in humans. When conducting laboratory studies and isolating *Y. pseudotuberculosis* strains from clinical material or from environmental objects, it becomes necessary to determine their genotype. Expanding the range of strain genotyping methods allows for a more comprehensive assessment of the genetic diversity of *Y. pseudotuberculosis* and the effective use of this data in epidemiological analysis. In this study, we used data on the localization of five IS elements (IS100, IS285, IS1541, IS1617, and IS630) in the genomes as specific targets for differentiating of pseudotuberculosis agent strains. The aim of this study was to develop a method for IS-genotyping of *Y. pseudotuberculosis* in PCR *in vitro* and *in silico*, and to use this method to analyze strains isolated in different years in Russia. For IS-genotyping of *Y. pseudotuberculosis*, a set of primers was developed that detect 13 IS-markers in the genomes of various strains of the pseudotuberculosis pathogen. The PCR results using these primers and DNA from 360 strains of *Y. pseudotuberculosis* allowed all the strains to be divided into 76 genetic groups (IS-genotypes). At the same time, Russian strains were included in 7 genogroups (IS2, IS3, IS4, IS5, IS9, IS10, IS13), four of which (IS2, IS3, IS5, IS10) also contained strains isolated worldwide, while the IS4, IS9, and IS13 groups consisted only of Russian strains. The proposed method of IS-genotyping, which has a high discriminatory potential (Simpson index of 0.921), can be used in combination with already known methods of *Y. pseudotuberculosis* genotyping.
Key words: Yersinia pseudotuberculosis, the causative agent of pseudotuberculosis, genotyping, IS elements, IS-genotyping, genetic diversity

For citation: Trukhachev A.L., Vostrova I.N., Vodopyanov A.S., Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T., Kokorina G.I., Bogumilchik E.A., Pisanov R.V., Temyakova S.Yu., Kovalevich A.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. IS-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Bacteriology. 2026; 11(3): 8–18. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-8-18

Молекулярно-генетическая характеристика вновь выявленных штаммов является одним из этапов лабораторной диагностики *Yersinia pseudotuberculosis*. Определение генетического разнообразия штаммов необходимо для характеристики природных очагов псевдотуберкулеза, установления филогенетических связей вновь выделенных штаммов, а также для эпидемиологического анализа. В настоящее время наиболее часто применяемым методом для изучения генетического разнообразия штаммов *Y. pseudotuberculosis* является выявление с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов вирулентности, что позволяет также оценить потенциальную опасность выделяемых штаммов. С помощью этого метода разными авторами [1–4] было выявлено от 6 до 14 генотипов возбудителя псевдотуберкулеза. Большее количество вариантов (30) было выявлено с помощью INDEL-типирования при использовании в ПЦР семи пар праймеров [5]. Более тонкая дифференциация штаммов достигается применением метода анализа мультилокусных вариабельных тандемных повторов (MLVA) [6–9], который позволяет различать даже близкородственные штаммы внутри одного очага.

В настоящее время для генетической дифференциации штаммов *Y. pseudotuberculosis* все чаще используются высокотехнологичные методы, которые требуют качественного полногеномного или фрагментарного секвенирования: типирование по единичным нуклеотидным полиморфизмам (SNP) [10, 11] и мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) [12, 13]. Для метода MLST создана компьютерная программа (https://antiplague.ru/scientific-activity/publication/mlst), которая в режиме offline определяет ST-тип штамма путем сравнения нуклеотидных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства» исследуемого штамма с нуклеотидными последовательностями этих генов в референтных штаммах известных ST-типов.

Расширение спектра ДНК-мишеней, используемых в различных методах, позволяет значительно повысить дискриминирующие возможности генотипирования штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. В нескольких исследованиях в разные годы в качестве таких мишеней было предложено использовать IS-элементы. В первых работах генотипирования иерсиний проводили с помощью оценки распределения IS-элементов в хромосоме иерсиний с помощью сложного и трудновоспроизводимого метода – IS-дактилоскопии [14, 15]. Простой и доступный способ IS-генотипирования с помощью ПЦР был предложен Motin et al. [16]. В этой работе для разделения по биоварам штаммов *Yersinia pestis* и их дифференциации от штаммов *Y. pseudotuberculosis* авторы использовали данные о различных местах внедрения одного инсерционного элемента (IS100). Для усовершенствования этого способа нами предложено использовать четыре IS-элемента (IS100, IS285, IS1541, IS1661), что позволило на основе IS-маркеров провести внутривидовую дифференциацию штаммов *Y. pestis* не только по биоварам, но и по различным подвидам [17].

В настоящем исследовании мы применили аналогичный способ, при котором в качестве специфических мишеней для дифференциации разных групп штаммов возбудителя псевдотуберкулеза использовались данные о локализации в геномах пяти IS-элементов (IS100, IS285, IS1541, IS1617, IS630). Целью работы стала разработка способа IS-генотипирования *Y. pseudotuberculosis* в ПЦР *in vitro* и *in silico* и анализ с помощью этого метода штаммов, выделенных в разные годы на территории России.

Материалы и методы

Штаммы и нуклеотидные последовательности

В работе использованы 55 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, из которых 43 выделены в различное время в России и 12 зарубежных (табл. 1). Штаммы иерсиний культивировали на плотной и жидкой среде Хоттингера (pH 7,2) и проверяли на соответствие паспортным данным по различным дифференциально-диагностическим тестам.

Все 55 штаммов были ранее секвенированы, что позволило использовать их полногеномные последовательности при биоинформатическом анализе. Применялись также сведения о 305 полных нуклеотидных последовательностях *Y. pseudotuberculosis* из различных баз данных, в которых содержалась информация о 17 штаммах, выделенных в России.

Анализ геномов *Y. pseudotuberculosis* с помощью методов биоинформатики для выявления IS-маркеров

Биоинформатический анализ проводили с помощью компьютерных программ BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov.) и Fragment Extractor 4.2.4. (https://antiplague.ru/scientific-activity/publication). Программа Fragment Extractor позволяет определять в контигах, полученных при секвенировании, наличие любых последовательностей ДНК (в т.ч. и IS-мутаций). Для филогенетического анализа различных штаммов *Y. pseudotuberculosis* были использованы компьютерные программы Mega 11 (https://www.megasoftware.net), Cytoscape v.3.10.4 (cytoscape.org) и авторская программа LocusTree. Способ анализа кластеров был основан на методе минимального остовного дерева MST (minimum spanning tree). Серопринадлежность большинства штаммов, полные нуклеотидные последовательности которых имеются в базах данных, не была известна. Для ее определения в настоящей работе использовали гено-серотипирование (ПЦР *in silico*) с праймерами, которые были разработаны для выяснения серотипов путем анализа хромосомного локуса, кодирующего синтез липополисахарида у различных штаммов псевдотуберкулезного микроба [18, 19]. При этом для части штаммов определить серотипы с помощью этого метода не удалось, поэтому для оценки связи выявленных генотипов с серопринадлежностью использовали 180 штаммов, серотип которых либо был известен, либо определен с помощью гено-серотипирования. Для филогеографического анализа из всех использованных штаммов отобраны 114, место выделения которых было известно.

Конструирование праймеров для ПЦР

Конструирование олигонуклеотидных праймеров проводилось на основе данных полногеномных нуклеотидных последовательностей разных штаммов с помощью специализированных компьютерных программ Vector NTI11 (Invitrogen) и BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) и «Евроген» (Москва, Россия) и использованы для ПЦР *in vitro* с ДНК различных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Режимы постановки ПЦР с праймерами были определены в соответствии с характеристиками сконструированных олигонуклеотидов.

Таблица 1. **Штаммы *Y. pseudotuberculosis*, использованные в работе**
Table 1. ***Y. pseudotuberculosis strains used in the work***

Место выделения / *Place of isolation*	Год выделения / *Year of isolation*	Количество штаммов / *Number of strains*
Владивосток / *Vladivostok*	1965	3
Томск / *Tomsk*	2021	7
Красноярск / *Krasnoyarsk*	2021	7
Санкт-Петербург / *St. Petersburg*	2000	7
Новый Уренгой / *Novy Urengoy*	2007	5
Зима / *Zima*	1998–2000	11
Великий Новгород / *Veliky Novgorod*	Н.д.	1
Горно-Алтайск / *Gorno-Altaysk*	1993	2
Зарубежные штаммы / *Foreign strains*	1972–1990	12

Н.д. – нет данных / *Н.д. – no data*

Оценка индекса биоразнообразия при проведении IS-генотипирования

Оценку биоразнообразия при использовании IS-генотипирования проводили с помощью индекса Симпсона [20], который определяли по формуле:

$$D = 1 - \frac{1}{N\,(N-1)} \sum_{j>1}^{S} n_j\,(n_j - 1),$$

где N – всего штаммов, n_j – количество штаммов, принадлежащих n_j группе, j = 1, 2, …, S. S – число генетических групп.

Результаты исследования и их обсуждение

Для выявления IS-маркеров штаммов возбудителя псевдотуберкулеза был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей трех штаммов *Y. pseudotuberculosis* различных серотипов: *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (серотип O:1b), *Y. pseudotuberculosis* YPIII (серотип O:3), *Y. pseudotuberculosis* PB1/+ (серотип O:1a). В исследованных локусах изучалось наличие пяти мобильных генетических элементов (IS100, IS285, IS1541, IS1617, IS630) или их остатков. В результате было обнаружено 15 локусов, содержащих IS-мутации, которые при анализе 300 штаммов из базы данных NCBI с помощью программы BLAST были специфичны для отдельных групп штаммов *Y. pseudotuberculosis*. На основании этих исследований были определены 15 IS-маркеров и сконструированы пары олигонуклеотидных праймеров для их детекции в ПЦР. Один из каждой пары праймеров был комплементарен последовательности гена, а другой – последовательности IS-элемента. При отсутствии у отдельных групп штаммов IS-элемента в анализируемом гене сконструированы праймеры, комплементарные интактному гену. Наличие IS-элемента в выявленных локусах определялось по амплификации специфического фрагмента ДНК определенной длины, синтез которого направлялся сконструированными праймерами в ПЦР (табл. 2).

Тестирование 55 штаммов в ПЦР *in vitro* и *in silico* с помощью 15 пар праймеров показало, что результаты ПЦР *in vitro* у нескольких штаммов с двумя парами праймеров (PsdT2 и PsdT12), в отличие от остальных 13, не совпадают с результатами ПЦР *in silico*. В итоге этого сравнения две пары праймеров PsdT2 и PsdT12, показавшие неоднозначные результаты, были исключены из набора праймеров.

Тестирование геномов 360 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью выбранных 13 пар праймеров в ПЦР in silico разделило штаммы по спектру амплифицированных фрагментов на 76 генетических групп. Набор 13 ПЦР-амплификатов позволял определять для каждого тестируемого штамма *Y. pseudotuberculosis* генетическую группу (IS-генотип), к которой он относится. Включение исследуемого штамма в одну из генетических групп свидетельствовало о его родстве со штаммами, находящимися в этой группе. Наибольшее число штаммов входили в генетические IS-группы 3 и 7, в которых находилось 69 и 62 штамма соответственно. Остальные 74 генетические группы включали от 23 до 1 штамма.

Оценку биоразнообразия 360 штаммов *Y. pseudotuberculosis* при IS-генотипировании проводили с помощью индекса

Таблица 2. **Праймеры, использованные для выявления IS-маркеров штаммов *Y. pseudotuberculosis*, и длина амплифицируемых фрагментов ДНК в ПЦР**
Table 2. ***Primers used to detect IS markers of Y. pseudotuberculosis strains and the length of amplified DNA fragments in PCR***

N	Пары праймеров / *Primer pairs*	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3') / *Nucleotide sequence of primers (5'-3')*	Ген-мишень для праймеров (согласно *Y. pseudotuberculosis* IP32953) / *Primer target gene (according to Y. pseudotuberculosis IP32953)*	Длина фрагмента (п.н.) / *Fragment length (bp)*
1	PsdT1	F: GTTGTTCCGCGAATAAGTGT	rsoS	282
		R: TTATTATCGAGTTCGGTGACC	IS285 (транспозаза / *transposase*)	
2	PsdT2	F: CGAAACACAGAAGTTACGCG	М.п.	338
		R: CAGCCTGTTTGAGTGCAAAA	YPTB0301 (IS1617)	
3	PsdT3	F: AAAACGGTGGATCAATATTGG	YPTB1586 (IS100)	319
		R: CATGGATGAATAACCTGCTCA	М.п. до YPTB1587	
4	PsdT4	F: AAATTGTCAGTTTTGATGGCAG	Интеграза/ Integrase	366
		R: GCACGATATGATCGGAAAATAA	YPTB1877 (псевдоген / *pseudogene*)	
5	PsdT5	F: GGGCACCATGGAAAATAGTC	интеграза	140
		R: TTCACCCTCCACAAAACATG	YPTB1877 (псевдоген / *pseudogene*)	
6	PsdT6	F: AACGCAAAAACTAGCCACAC	интеграза	204
		R: CGGCGGTTAACGATATACTC	YPTB1877 (псевдоген / *pseudogene*)	
7	PsdT7	F: TGGCTGTCATACTACATGTGC	YPTB1881	138
		R: GTCACGACAGACGCGAAACT	IS1541 (транспозаза / *transposase*)	
8	PsdT8	F: CCGTACAGTCATACGTATAGTCAAA	YPTB1892	137
		R: TGACATTAAATCCAGAGCGG	М.п. после YPTB1891	
9	PsdT9	F: GGTGAGCAACTCTCGATCCC	YPTB2003 (IS1541)	259
		R: AGCCAGGGTGAAGCCAATTT	ychM	
10	PsdT10	F: CTAAGGTATAATTCTTCTCCCTCAG	YPTB2523	203
		R: ACTGAAAAAATGCAGGGGAG	YPTB2524	
11	PsdT11	F: GAAGCTAACGCGAATGATTC	YPTB2751 (IS630)	218
		R: TACTAATTCGTGCCACCGAT	YPTB2752 (IS630)	
12	PsdT12	F: CTGATAAGTGTAGGTCAGTTGGA	YPTB3255 (insA)	267
		R: CCTTGTTTAGTAGTGCAGATAATGT	YPTB3256	
13	PsdT13	F: CAATACAGAGCGCATTAGCC	YPTB3310	264
		R: AGAGAAGGCAAGGAAAACGG	М.п. до YPTB3311	
14	PsdT14	F: TTGCTAAATAACGGCTTTACTG	YPTB3934	266
		R: GCTAAGTTCAGTGGCGTTATATAA	YPTB3934	
15	PsdT15	F: GTTAGCGATGAGCCGTTTTA	YPTB3311 (IS285)	164
		R: GCCTCCTCTTTAAATGAGGA	YPTB3312	

F (Forward) – прямой праймер; R (Reverse) – обратный праймер; п.н. – пар нуклеотидов; М.п. – межгенное пространство. / *F (Forward) – forward primer; R (Reverse) – reverse primer; bp – nucleotide pairs; Mp – intergenic space*.

Симпсона, показывающего вероятность, с которой любые два случайно взятых штамма из исследуемой популяции будут иметь различные генотипы. Индекс Симпсона вычисляли для каждой пары праймеров, а также определяли для метода IS-генотипирования при использовании 13 пар праймеров (табл. 3).

Индекс Симпсона для IS-генотипирования оказался высоким – 0,921, что свидетельствует о хорошем дискриминационном потенциале метода. Величина индекса Симпсона >0,9 указывает также на достоверность полученных результатов, которая основывается на использовании для анализа достаточно большого количества объектов. При этом каждая пара праймеров разделяла все исследуемые штаммы на две группы, дающие либо положительный, либо отрицательный результат. Все полученные группы при вычислении индекса биоразнообразия для каждой пары праймеров отдельно содержали не менее трех штаммов. Значение индекса >0 отмечается при наличии в каждой из двух групп более чем одного штамма.

Филогенетические связи 360 штаммов были установлены с помощью матрицы кластеров (спектр результатов ПЦР по каждой паре праймеров) и программы LocusTree с использованием алгоритма MST. При этом программа формировала кластеры филогенетического дерева, в которые объединялись штаммы, имеющие один IS-генотип или различающиеся по одному IS-маркеру. На рис. 1 представлена MST-дендрограмма, построенная на основе анализа IS-маркеров в геномах 360 штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Анализ распределения штаммов по генетическим кластерам с помощью программы LocusTree показал, что 48 из 60 российских

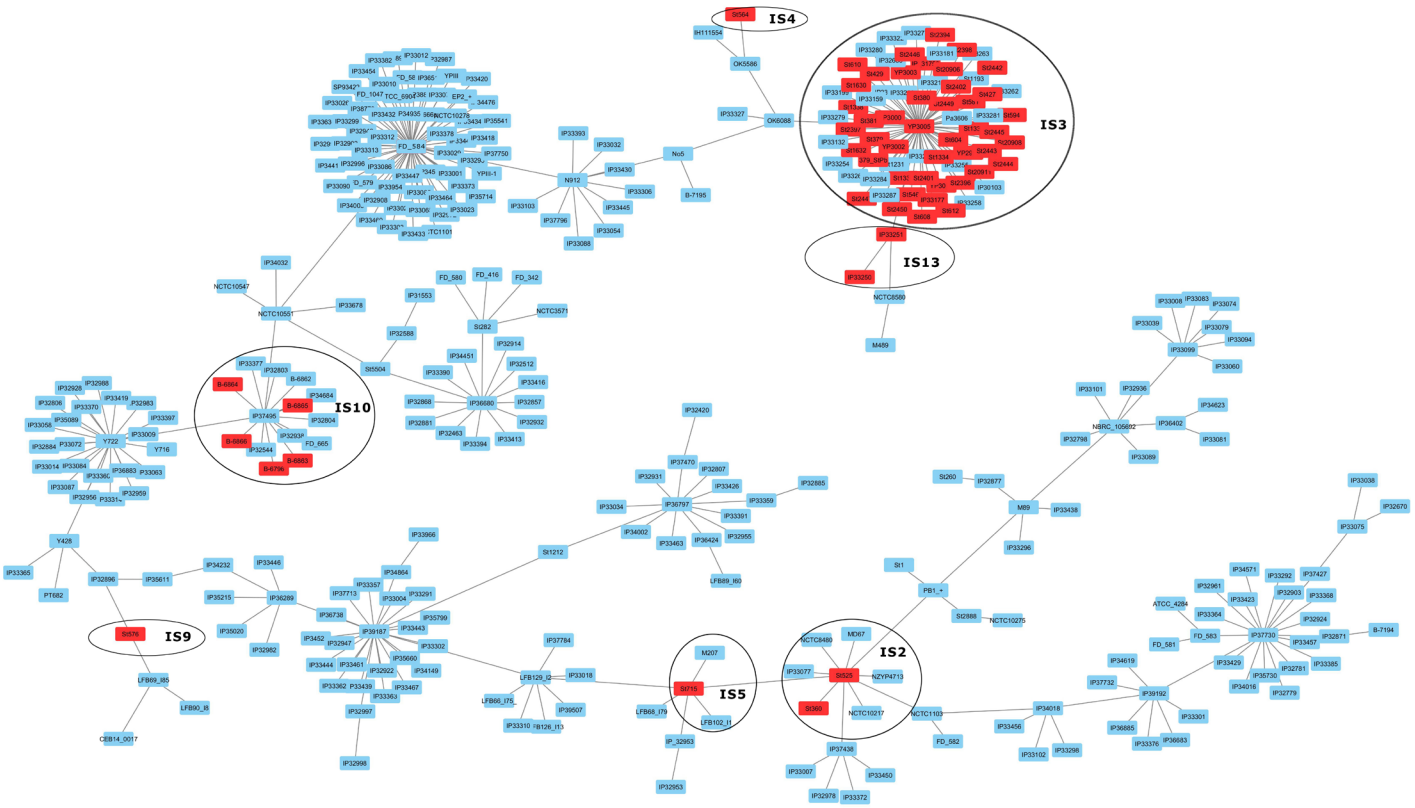


Рис. 1. **MST-дендрограмма филогенетических связей 360 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, построенная на основе различий по IS-маркерам. Красным цветом отмечены штаммы, выделенные в России. На рисунке выделены генетические группы с российскими штаммами.**
*Fig. 1. **MST dendrogram of phylogenetic relationships of 360 Y. pseudotuberculosis strains, constructed based on differences in IS markers. Strains isolated in Russia are highlighted in red. Genetic groups containing Russian strains are highlighted in the figure.***

Таблица 3. **Результаты определения индекса биоразнообразия Симпсона при типировании 360 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью IS-маркеров**
*Table 3. **Results of determining the Simpson Biodiversity Index when typing 360 Y. pseudotuberculosis strains using IS markers***

Праймеры / *Primers*	Кол-во штаммов, дающих отрицательный результат с праймерами / *Number of strains giving negative results with primers*	Кол-во штаммов, дающих положительный результат с праймерами / *Number of strains giving a positive result with primers*	Индекс разнообразия (1-D) / *Diversity Index (1-D)*
PsdT1	321	39	0,193
PsdT2*	230	130	0,463
PsdT3	220	140	0,475
PsdT4	226	134	0,468
PsdT5	153	207	0,489
PsdT6	209	151	0,487
PsdT7	230	130	0,461
PsdT8	263	97	0,394
PsdT9	353	7	0,038
PsdT10	234	126	0,455
PsdT11	104	256	0,411
PsdT12*	50	310	0,239
PsdT13	329	31	0,157
PsdT14	63	297	0,289
PsdT15	357	3	0,017
Индекс Симпсона для метода IS-типирования / *Simpson index for the IS typing method*			**0,921**

*Результаты по праймерам в общей оценке метода IS-типирования не использовались. / **The results for primers were not used in the overall evaluation of the IS typing method.*

штаммов, используемых в работе, попали в один генетический кластер, включающий штаммы серотипа O:1b и генотипа IS3. В этот же кластер входят еще два российских штамма IS13-генотипа (IP33250 и IP33251), которые отличались от штаммов IS3-группы по одному IS-маркеру (рис. 1). Пять штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных в Ставропольском крае и имеющих серотип O:3 и генотип IS10, входили в отдельный кластер. Остальные пять штаммов были распределены по четырем IS-группам (2, 4, 5, 9) и формировали четыре различных генетических кластера (рис. 1).

Интересно отметить, что три из этих пяти штаммов были выделены в сибирском городе Зиме в 1988–1989 гг. Большинство штаммов из очагов инфекции в Зиме имели серотип O:1b и ST26. Среди необычных для этой вспышки трех штаммов, которые были использованы в работе, два штамма (564 и 576) серотипа O:1b имели ST26, а один штамм (525) серотипа O:1a был отнесен к ST9-генотипу [21]. Типирование этих трех штаммов (564, 576, 525) с помощью IS-маркеров показало, что все они имеют различные IS-генотипы (IS2, IS4, IS9) (табл. 3, 4), которые отличались от IS-генотипа (IS3) всех остальных использованных в работе штаммов, выделенных в Зиме в 1998–2000 гг.

О факте выделения в Зиме штаммов, имеющих три различных риботипа, было известно и ранее [22]. Однако в настоящей работе мы с помощью IS-генотипирования обна-

Таблица 4. **Генетическое разнообразие штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных в 1998–2000 гг. в г. Зиме**
*Table 4. **Genetic diversity of Y. pseudotuberculosis strains isolated in 1998–2000 in Zima***

Характеристика / *Characteristics*	Название или количество штаммов / *Name or number of strains*					
	564	576	525	604	3 штамма / *strains*	4 штамма / *strains*
Серотип* / *Serotype*	O:1b	O:1b	O:1a	O:1b	O:1b	O:1b
Генетическая группа* / *Genetic group*	1a: YPM A+ HPI+	1a: YPM A+ HPI+	1a: YPM A+ HPI+	3d: YPM A+, pVM82+	3a: YPM A+	3a: YPM A+
Риботип* / *Ribotype*	9	9	9	32	30	32
2IS-генотип** / *2IS genotype*	80	80	80	87	87	87
ST***	26	26	9	26	26	26
IS-генотип**** / *IS genotype*	4	9	2	3	3	3

* сведения из паспорта штамма и данных [22]; ** сведения из паспорта штамма, согласно «геномной дактилоскопии» с использованием мишеней для двух IS-элементов [15]; *** сведения из статьи [21]; **** данные настоящего исследования. / ** information from the strain passport and data [22]; ** information from the strain passport, according to "genomic fingerprinting" using targets for two IS elements [15]; *** information from the article [21]; **** data from the present study.*

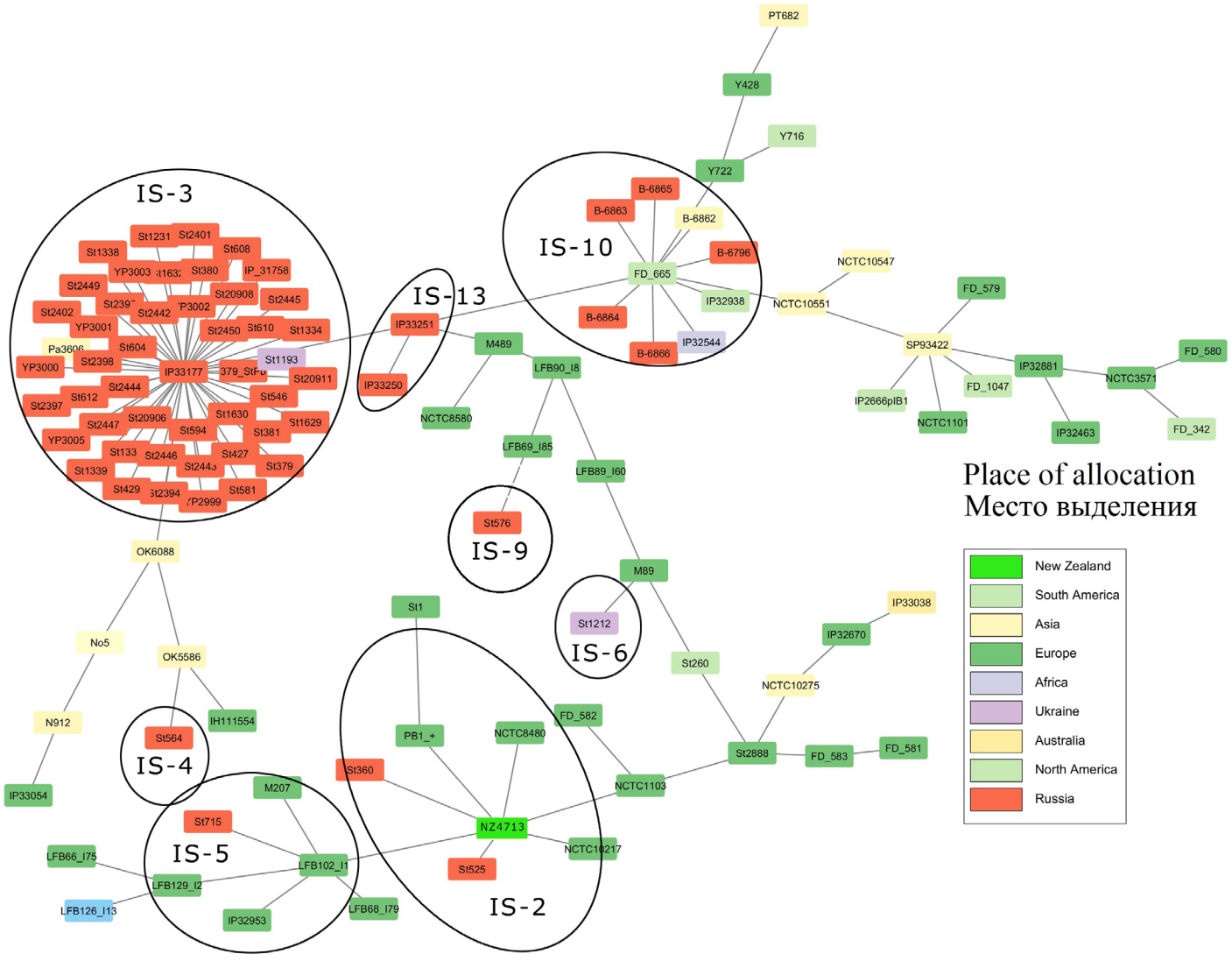


Рис. 2. **MST-дендрограмма, построенная на основе различий IS-маркеров, 114 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с известным местом выделения. На рисунке выделены генетические группы с российскими и украинскими штаммами.**
*Fig. 2. **MST dendrogram constructed based on differences in IS markers for 114 Y. pseudotuberculosis strains with known isolation sites. The figure highlights genetic groups with Russian and Ukrainian strains.***

ружили большее разнообразие генотипов у штаммов из этого региона. Было установлено, что все штаммы *Y. pseudotuberculosis*, выделенные в Зиме, разделялись по наличию различных факторов вирулентности на три генетические группы, на три риботипа, на два ST-типа, на два 2IS-типа. По IS-маркерам эти же штаммы разделялись на четыре генотипа (табл. 3), что свидетельствует о большей эффективности способа IS-генотипирования. Таким образом, было под-

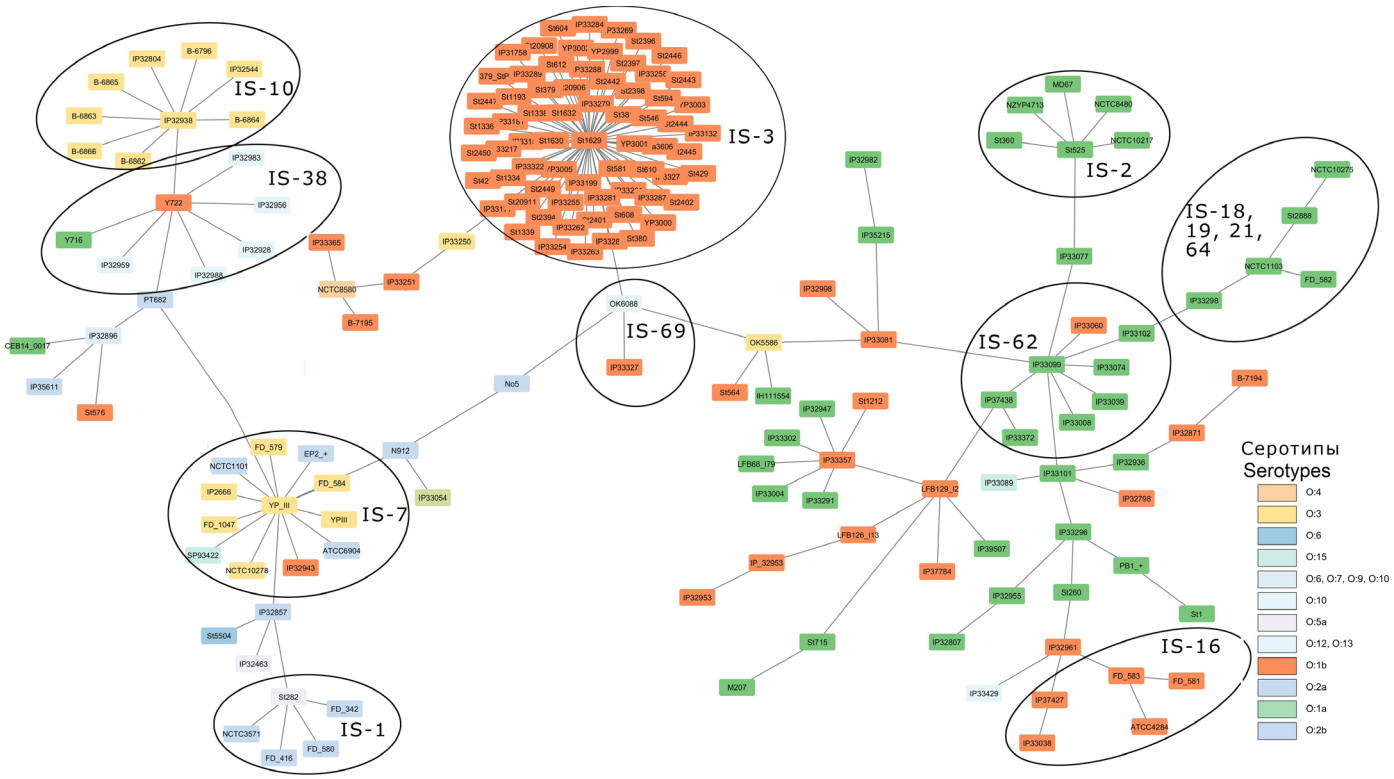


Рис. 3. **MST-дендрограмма филогенетических связей 180 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с известным серотипом.**
*Fig. 3. **MST dendrogram of phylogenetic relationships of 180 Y. pseudotuberculosis strains with a known serotype.***

тверждено, что в одном очаге, на одной территории в России могут циркулировать штаммы, существенно отличающиеся по своему генотипу. Это, скорее всего, произошло вследствие заноса штаммов из других регионов. Филогеографический анализ 114 штаммов *Y. pseudotuberculosis* показал, что российские штаммы распределялись как в «азиатские», так и в «европейские» кластеры (рис. 2). Так, два штамма из Зимы (576 и 525, генотипы IS2 и IS9 соответственно) принадлежат к кластерам штаммов «европейского» типа, тогда как большинство штаммов из Сибири и Дальнего Востока входили в кластер IS3, содержащий «азиатские» штаммы. К «европейским» штаммам *Y. pseudotuberculosis*, выделенным в европейской части России, можно также отнести штаммы 360 серотипа O:1a (Санкт-Петербург) и 715 серотипа O:1a (Великий Новгород), которые попали в кластеры штаммов из Европы IS2 и IS5 соответственно (рис. 2). В дальнейшем будем обозначать кластеры по названию генетических групп, штаммы которых преобладают в кластере.

Два штамма из Украины, выделенные от грызунов в 2005 г. в Хмельницкой области, оказались штаммами различных генотипов. Один украинский штамм – *Y. pseudotuberculosis* 1193 – попал в кластер IS3 и был охарактеризован как штамм «азиатского» типа, а другой, 1212, имея генотип IS6, является штаммом «европейского» типа (рис. 2). Российские штаммы *Y. pseudotuberculosis*, выделенные в Северо-Западном регионе, принадлежат в основном к «азиатскому» типу и имеют генотип IS3. Еще один кластер (IS10), содержащий российские штаммы из Ставрополя и Санкт-Петербурга, включает штаммы, выделенные на различных континентах. В одной из работ по генотипированию с использованием CRISPR [23] штаммы такого типа были обозначены как «промежуточные», а в другой работе [24], использующей метод SNP-типирования, – как «межконтинентальные».

Филогенетический анализ штаммов *Y. pseudotuberculosis* с известным серотипом показал, что большинство штаммов, входящих в одну генетическую группу при IS-генотипировании, имеют одинаковый серотип (рис. 3). Однако эта закономерность соблюдается не всегда. Так, в кластере генотипа IS7, в котором большинство составляют штаммы серотипа O:3, содержатся и штаммы с серотипами O:1b, O:2a, O:3 и O:15, выделенные на различных континентах. В кластере IS38 при доминировании штаммов серотипов O:12 и O:13 присутствуют штаммы серотипа O:1a, а в кластере IS1 среди штаммов серотипа O:2b оказался один штамм O:5a, так же как и среди штаммов серотипа O:1a в кластере IS-62 был обнаружен один штамм серотипа O:1b. Кластер IS69 составляют два штамма (IP33327 и OK6088), имеющие серотипы O:1b и O:10 соответственно. Отсутствие подобной закономерности было отмечено ранее и при использовании других методов типирования: MLVA [9], CRISPR [22], MLST [25], INDEL [5] и SNP [24]. Причиной отсутствия строгой корреляции между серотипом и IS-генотипом штаммов *Y. pseudotuberculosis* может быть возникновение отдельных клонов измененных серотипов у штаммов одной генетической группы в результате мутагенеза и рекомбинационных процессов в опероне, отвечающих за формирование серотипа [25].

Таким образом, проведенные исследования показали, что генотипирование, основанное на анализе с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro* мест расположения в геноме маркерных IS-элементов, позволяет выявить генетическое разнообразие штаммов *Y. pseudotuberculosis*. IS-генотипирование российских штаммов возбудителя псевдотуберкулеза распределило их по семи генетическим группам (IS2, IS3, IS4,

IS5, IS9, IS10 и IS13), причем группы IS4, IS9 и IS13 включали только штаммы из России. Наибольшее количество российских штаммов (48), которые можно отнести к «азиатскому» типу, содержалось в генетической группе IS3. Анализ штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью IS-генотипирования дает возможность проводить эффективную генетическую внутривидовую дифференциацию штаммов, выделенных в одном очаге или в одной географической зоне. Этот способ генотипирования имеет высокий дискриминационный потенциал (индекс Симпсона – 0,921) и может быть использован в комплексе с другими методами молекулярно-генетического анализа штаммов возбудителя псевдотуберкулеза.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Funding

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Трухачев А.Л. – общее руководство, формулировка цели работы, конструирование праймеров, создание матрицы результатов для генотипирования, описание и анализ данных; Вострова И.Н. – ПЦР-анализ in vitro, сравнение результатов ПЦР-анализа in vitro и in silico, анализ данных, оптимизация набора праймеров для IS-генотипирования; Водопьянов А.С. – применение авторских компьютерных программ Fragment Extractor и LocusTree, сборка геномов секвенированных штаммов; Мелоян М.Г. – вычисление индекса Симпсона для пар праймеров и для IS-генотипирования, определение гено-серотипа и MLST-типа штаммов; Воскресенская Е.А. –типирование штаммов по генам вирулентности, риботипирование и 2IS-типирование, секвенирование и определение фенотипических свойств штаммов; Чеснокова М.В. – типирование штаммов по генам вирулентности и риботипирование, секвенирование и определение фенотипических свойств штаммов; Климов В.Т. – типирование по генам вирулентности, секвенирование и определение фенотипических свойств штаммов; Кокорина Г.И. – типирование по генам вирулентности и серогенотипирование, секвенирование и определение фенотипических свойств штаммов; Богумильчик Е.А. – типирование по генам вирулентности, секвенирование и определение фенотипических свойств штаммов; Писанов Р.В. – секвенирование и сборка геномов секвенированных штаммов; Темякова С.Ю. – секвенирование штаммов; Ковалевич А.А. – секвенирование штаммов; Рыкова В.А. – изучение свойств штаммов (серотип, отношение к бактериофагам, ферментативные особенности), плазмидный скрининг; Подладчикова О.Н. – консультанции по методам исследования, анализ данных, оформление и редактирование текста статьи.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Authors contribution

Trukhachev A.L. – general management, formulation of the study's objectives, primer design, creation of a results matrix for genotyping, data description and analysis; Vostrova I.N. – in vitro PCR analysis, comparison of in vitro and in silico PCR analysis results, data analysis, optimization of the primer set for IS genotyping; Vodopyanov A.S. – use of proprietary software programs Fragment Extractor and LocusTree, assembly of the sequenced strain genomes; Meloyan M.G. – calculation of the Simpson index for primer pairs and for IS genotyping, determination of the genotype, serotype, and MLST type of the strains; Voskresenskaya E.A. – strain typing by virulence genes, ribotyping and 2IS typing, sequencing, and determination of the phenotypic properties of the strains; Chesnokova M.V. – Typing of strains by virulence genes and ribotyping, sequencing, and determination of their phenotypic properties; Klimov V. T. – Typing of strains by virulence genes, sequencing, and determination of their phenotypic properties; Kokorina G.I. – Typing of strains by virulence genes, sero-genotyping, sequencing, and determination of their phenotypic properties; Bogumilchik E.A. – Typing of strains by virulence genes, sequencing, and determination of their phenotypic properties; Pisanov R.V. – Sequencing and assembly of the genomes of sequenced strains; Temyakova S.Yu. – Sequencing of strains; Kovalevich A.A. – Sequencing of strains; Rykova V.A. – Studied the properties of strains (serotype, relation to bacteriophages, enzymatic properties), plasmid screening; Podladchikova O.N. – consultant on research methods, data analysis, design and editing of the article text.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, Tsubokura M, Takeda N, Shubin FN, et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia*

pseudotuberculosis strains. J Clin Microbiol. 2001 Oct;39(10):3541-7. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001
2. Чеснокова МВ, Климов ВТ, Марамович АС. Генотипирование *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;6:20-25.
3. Каримова ТВ, Климов ВТ, Чеснокова МВ. Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. Бюллетень ВСНЦ СО РАМ. 2016;1(3):60-64.
4. Кокорина ГИ, Сайнес ТВ, Трухачев АЛ, Воскресенская ЕА. Генотипы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, распространенных на территории г. Ленинграда – Санкт-Петербурга. Проблемы медицинской микологии. 2023;25(2):127.
5. Трухачев АЛ, Мелоян МГ, Воскресенская ЕА, Водопьянов АС, Водопьянов СО, Подладчикова ОН, и др. INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;4:102-109. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109
6. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001;1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2
7. Halkilahti J, Haukka K, Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). J Microbiol Methods. 2013 Nov;95(2):245-50. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.09.007
8. Евсеева ВВ, Платонов МЕ, Дентовская СВ, Анисимов АП. Типирование *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью мультилокусного анализа вариабельного числа тандемных повторов. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:55-57. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-55-57
9. Sannö A, Rosendal T, Aspán A, Backhans A, Jacobson M. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Profiles of Enteropathogenic *Yersinia* spp. Obtained from Humans, Domestic Pigs, Wild Boars, Rodents, Pork and Dog Food. Animals (Basel). 2023 Sep 29;13(19):3055. DOI: 10.3390/ani13193055
10. Zhgenti E, Hu P, Chanturia G, Tsereteli D, Kekelidze M, Chubinidze S, et al. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. Arch Microbiol. 2018 Nov;200(9):1345-1355. DOI: 10.1007/s00203-018-1545-8
11. Savin C, Le Guern AS, Chereau F, Guglielmini J, Heuzé G, Demeure C, et al. First Description of a *Yersinia pseudotuberculosis* Clonal Outbreak in France, Confirmed Using a New Core Genome Multilocus Sequence Typing Method. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0114522. DOI: 10.1128/spectrum.01145-22
12. Duan R, Liang J, Shi G, Cui Z, Hai R, Wang P, et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):20-9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13
13. Laukkanen-Ninios R, Didelot X, Jolley KA, Morelli G, Sangal V, Kristo P, et al. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing. Environ Microbiol. 2011 Dec;13(12):3114-27. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x
14. Odaert M, Berche P, Simonet M. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* by using an IS200-like element. J Clin Microbiol. 1996 Sep;34(9):2231-5. DOI: 10.1128/jcm.34.9.2231-2235.1996
15. Voskresenskaya E, Savin C, Leclercq A, Tseneva G, Carniel E. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* isolates by restriction fragment length polymorphism analysis using insertion sequences. J Clin Microbiol. 2014 Jun;52(6):1978-89. DOI: 10.1128/JCM.00397-14
16. Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). J Bacteriol. 2002 Feb;184(4):1019-27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002
17. Трухачев АЛ, Мелоян МГ, Водопьянов АС, Подладчикова ОН, Ковалевич АА, Темякова СЮ, и др. IS-генотипирование штаммов *Y. pestis* с помощью ПЦР. Бактериология. 2024;9(1):72-80.
18. Bogdanovich T, Carniel E, Fukushima H, Skurnik M. Use of O-Antigen Gene Cluster-Specific PCRs for the Identification and O-Genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. J Clinical microbiol. 2003;41:5103-12. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003
19. Kenyon JJ, Cunneen MM, Reeves PR. Genetics and evolution of *Yersinia pseudotuberculosis* O-specific polysaccharides: a novel pattern of O-antigen diversity. FEMS Microbiol Rev. 2017 Mar 1;41(2):200-217. DOI: 10.1093/femsre/fux002
20. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465-6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988
21. Мелоян МГ, Водопьянов АС, Воскресенская ЕА, Писанов РВ, Чеснокова МВ, Климов ВТ, и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных на территории России, с помощью MLST. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;4:107-114. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-107-114
22. Чеснокова МВ. Псевдотуберкулез в Сибири: Теоретические и прикладные аспекты эпидемиологии, лабораторной диагностики и профилактики. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. 14.00.30. Науч. центр мед. экологии ВСНЦ СО РАМН. Иркутск, 2004.
23. Seecharran T, Kalin-Manttari L, Koskela K, Nikkari S, Dickins B, Coranderet J, et al. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbial Genomics. 2017;3(10):e000133. DOI: 10.1099/mgen.0.000133
24. Meloyan M, Vodopyanov A, Voskresenskaya E, Trukhachev A. SNP genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*. Yersinia 15 Abstract book. Ulaanbaator, Mongolia. 2025;44.
25. Ch'ng SL, Octavia S, Xia Q, Duong A, Tanaka MM, Fukushima H, et al. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. Appl Environ Microbiol. 2011 Feb;77(3):768-75. DOI: 10.1128/AEM.01993-10

References

1. Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, Tsubokura M, Takeda N, Shubin FN, et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. J Clin Microbiol. 2001 Oct;39(10):3541-7. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001
2. Chesnokova MV, Klimov VT, Maramovich AS. Genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated in Siberia and the Far East. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2006;6:20-25. (In Russian).
3. Karimova TV, Klimov VT, Chesnokova MV. Molecular and biological characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated in Siberia and the Far East. Bulletin of the VSNTS SB RAM. 2016;1(3):60-64. (In Russian).
4. Kokorina GI, Saines TV, Trukhachev AL, Voskresenskaya EA. Genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis* strains distributed in Leningrad – St. Petersburg. Problems of Medical Mycology. 2023;25(2):127. (In Russian).
5. Trukhachev AL, Meloyan MG, Voskresenskaya EA, Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Podladchikova ON, et al. INDEL-typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;4:102-109. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109 (In Russian).
6. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of

Yersinia pestis and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001;1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2

7. Halkilahti J, Haukka K, Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). J Microbiol Methods. 2013 Nov;95(2):245-50. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.09.007
8. Evseeva VV, Platonov ME, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Typing of *Yersinia pseudotuberculosis* using multilocus analysis of the variable number of tandem repeats. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2015;4:55-57. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-55-57 (In Russian).
9. Sannö A, Rosendal T, Aspán A, Backhans A, Jacobson M. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Profiles of Enteropathogenic *Yersinia* spp. Obtained from Humans, Domestic Pigs, Wild Boars, Rodents, Pork and Dog Food. Animals (Basel). 2023 Sep 29;13(19):3055. DOI: 10.3390/ani13193055
10. Zhgenti E, Hu P, Chanturia G, Tsereteli D, Kekelidze M, Chubinidze S, et al. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. Arch Microbiol. 2018 Nov;200(9):1345-1355. DOI: 10.1007/s00203-018-1545-8
11. Savin C, Le Guern AS, Chereau F, Guglielmini J, Heuzé G, Demeure C, et al. First Description of a *Yersinia pseudotuberculosis* Clonal Outbreak in France, Confirmed Using a New Core Genome Multilocus Sequence Typing Method. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0114522. DOI: 10.1128/spectrum.01145-22
12. Duan R, Liang J, Shi G, Cui Z, Hai R, Wang P, et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):20-9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13
13. Laukkanen-Ninios R, Didelot X, Jolley KA, Morelli G, Sangal V, Kristo P, et al. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing. Environ Microbiol. 2011 Dec;13(12):3114-27. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x
14. Odaert M, Berche P, Simonet M. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* by using an IS200-like element. J Clin Microbiol. 1996 Sep;34(9):2231-5. DOI: 10.1128/jcm.34.9.2231-2235.1996
15. Voskresenskaya E, Savin C, Leclercq A, Tseneva G, Carniel E. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* isolates by restriction fragment length polymorphism analysis using insertion sequences. J Clin Microbiol. 2014 Jun;52(6):1978-89. DOI: 10.1128/JCM.00397-14
16. Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). J Bacteriol. 2002 Feb;184(4):1019-27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002
17. Trukhachev AL, Meloyan MG, Vodopyanov AS, Podladchikova ON, Kovalevich AA, Temyakova SYu, et al. IS genotyping of *Y. pestis* strains using PCR. Bacteriology. 2024;9(1):72-80. (In Russian).
18. Bogdanovich T, Carniel E, Fukushima H, Skurnik M. Use of O-Antigen Gene Cluster-Specific PCRs for the Identification and O-Genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. J Clinical microbiol. 2003;41:5103-12. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003
19. Kenyon JJ, Cunneen MM, Reeves PR. Genetics and evolution of *Yersinia pseudotuberculosis* O-specific polysaccharides: a novel pattern of O-antigen diversity. FEMS Microbiol Rev. 2017 Mar 1;41(2):200-217. DOI: 10.1093/femsre/fux002
20. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465-6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988
21. Meloyan MG, Vodopyanov AS, Voskresenskaya EA, Pisanov RV, Chesnokova MV, Klimov VT, et al. Genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated in Russia using MLST. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;4:107-114. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-107-114 (In Russian).
22. Chesnokova MV. Pseudotuberculosis in Siberia: Theoretical and applied aspects of epidemiology, laboratory diagnostics and prevention: abstract of the dissertation... Doctors of Medical Sciences: 14.00.30. Scientific Center of Medical Ecology of the All-Russian Scientific Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences. Irkutsk, 2004. (In Russian).
23. Seecharran T, Kalin-Manttari L, Koskela K, Nikkari S, Dickins B, Coranderet J, et al. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbial Genomics. 2017;3(10):e000133. DOI: 10.1099/mgen.0.000133
24. Meloyan M, Vodopyanov A, Voskresenskaya E, Trukhachev A. SNP genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*. Yersinia 15 Abstract book. Ulaanbaator, Mongolia. 2025;44.
25. Ch'ng SL, Octavia S, Xia Q, Duong A, Tanaka MM, Fukushima H, et al. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. Appl Environ Microbiol. 2011 Feb;77(3):768-75. DOI: 10.1128/AEM.01993-10

Информация о соавторах:

Вострова Ирина Николаевна, младший научный сотрудник отдела профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Мелоян Мисак Геворгович, научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-7268-9298

Воскресенская Екатерина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6380-1153

Чеснокова Маргарита Валентиновна, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России
ORCID: 0000-0001-5489-9363

Климов Валерий Тимофеевич, старший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0036-0017

Кокорина Галина Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1973-3138

Богумильчик Елена Александровна, научный сотрудник лаборатории медицинской микробиологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3181-4328

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

Темякова Светлана Юрьевна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-4472-0264

Ковалевич Алексей Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6926-0239

Рыкова Виолетта Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Подладчикова Ольга Николаевна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-7178-2255

Information about co-authors:

Irina N. Vostrova, Junior Researcher of the Department of Professional Retraining and Advanced Training of Specialists, Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor

Aleksey S. Vodopyanov, PhD, MD, Leading Researcher at the Laboratory of Molecular Biology Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

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

Ekaterina A. Voskresenskaya, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Medical Microbiology Laboratory, Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Rospotrebnadzor

Margarita V. Chesnokova, MD, PhD, DSc, Professor at the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Pirogov Russian National Research Medical University

Valery T. Klimov, PhD, MD, Senior Researcher of the Epidemiology department, Irkutsk Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor

Galina I. Kokorina, PhD, MD, Senior Researcher at the Medical Microbiology Laboratory, Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Rospotrebnadzor

Elena A. Bogumilchik, Researcher at the Medical Microbiology Laboratory, Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Rospotrebnadzor

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Head at the Laboratory of Molecular Biology Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Alexey A. Kovalevich, Researcher at the Laboratory of Molecular Biology Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

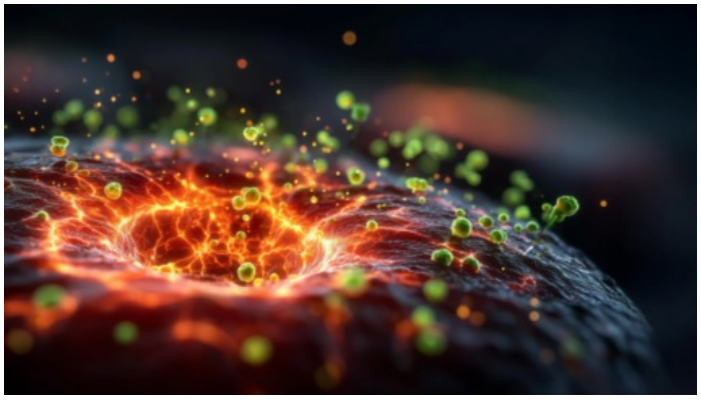
Svetlana Y. Temyakova, Researcher at the Laboratory of Molecular Biology Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Rykova V. Alexandrovna, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Olga N. Podladchikova, PhD in Chemical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерия уничтожила раковые опухоли у мышей после однократного введения



Использование кишечной микробиоты в терапии рака привлекает значительное внимание как новое перспективное направление. Проведена систематическая оценка противоопухолевых свойств девяти штаммов бактерий, выделенных из кишечника земноводных *Dryophytes japonicus* и **Cynops pyrrhogaster* и рептилии *Takydromus tachydromoides*. Среди изученных изолятов *Ewingella americana* продемонстрировала выраженную цитотоксическую активность, а также способность избирательно воздействовать на опухолевые клетки. *E. americana* действует по двум направлениям: непосредственно уничтожает опухолевые клетки и активирует иммунную систему организма, усиливая атаку на опухоль со стороны Т-лимфоцитов, нейтрофилов и В-лимфоцитов. В экспериментах по регрессии опухолей терапия с применением *E. americana* показала значительно более высокие результаты по сравнению со стандартными методами лечения, включая использование антител к PD-L1 и доксорубицина. Комплексная оценка безопасности на мышиных моделях подтвердила: штамм *E. americana* обладает минимальной патогенностью и в терапевтически эффективных дозах не вызывает значимых побочных эффектов, что выгодно отличает его от генетически модифицированных бактериальных препаратов. Сравнительный анализ продемонстрировал превосходство *E. americana* над традиционными методами лечения при сохранении высокого профиля безопасности. Полученные результаты позволяют предположить, что кишечные микробиомы низших позвоночных содержат множество еще не изученных видов бактерий, обладающих исключительным терапевтическим потенциалом. Это исследование закладывает основу для разработки природных, непатогенных бактериальных препаратов и подчеркивает важнейшую роль микробного биоразнообразия в совершенствовании стратегий лечения рака.

Iwata S, Yamasita N, Asukabe K, Sakari M, Miyako E.
Discovery and characterization of antitumor gut microbiota from amphibians and reptiles: Ewingella americana as a novel therapeutic agent with dual cytotoxic and immunomodulatory properties.
Gut Microbes. 2025 Dec 31;17(1):2599562. DOI: 10.1080/19490976.2025.2599562

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-19-25

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 19–25
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 19–25

Высокомолекулярный гликоконъюгат нативного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b с белком-носителем CRM197: получение, физико-химическая и иммунологическая характеристика

П.А.Стряхнин, П.Г.Апарин, С.В.Коробова, И.Ю.Курбатова, Б.И.Алхазова, В.А.Ледов

ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

Цель. Получить растворимый конъюгат нативного высокомолекулярного полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) *Haemophilus influenzae* типа b с нетоксичным мутантным дифтерийным токсином – белком CRM197, без предварительной деполимеризации ПРФ, и оценить его физико-химические, антигенные и иммуногенные свойства.
Материалы и методы. Нативный ПРФ конъюгировали с белком CRM197. Продукт очищали на Sephacryl S-300 и характеризовали методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектированием. Содержание ПРФ, белка, нуклеиновых кислот и бактериальных эндотоксинов определяли соответствующими аналитическими методами. Сохранность антигенных детерминант оценивали в прямом и конкурентном иммуноферментном анализе (ИФА). Иммуногенность конъюгата ПРФ-CRM197 исследовали на кроликах. Протективные свойства иммунного ответа на ПРФ-CRM197 оценивали по выживаемости иммунизированных конъюгатом лабораторных животных (мышей) после их экспериментального заражения бактерией *H. influenzae* типа b.
Результаты. Получен водорастворимый конъюгат ПРФ-CRM197. Массовое соотношение ПРФ и CRM197 в очищенном образце составляло 1:1. Содержание нуклеиновых кислот не превышало 0,1%, содержание бактериальных эндотоксинов составляло 7 ЭЕ/мг. В прямом и конкурентном ИФА подтверждена сохранность антигенных детерминант ПРФ и CRM197. После повторной иммунизации кроликов отмечено повышение титров Hib-специфических IgG-антител. У мышей, иммунизированных ПРФ-CRM197, выживаемость после заражения была выше, чем в контрольных группах.
Заключение. Прямая CDAP-конъюгация нативного высокомолекулярного ПРФ с CRM197 позволяет получить высокоочищенный, безопасный и растворимый гликоконъюгат, сохраняющий антигенные свойства обоих компонентов и проявляющий иммуногенность в экспериментах на лабораторных животных.
Ключевые слова: Haemophilus influenzae типа b, полирибозилрибитолфосфат, CRM197, гликоконъюгат, CDAP, эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ, иммуногенность, вакцинация

Для цитирования: Стряхнин П.А., Апарин П.Г., Коробова С.В., Курбатова И.Ю., Алхазова Б.И., Ледов В.А. Высокомолекулярный гликоконъюгат нативного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b с белком-носителем CRM197: получение, физико-химическая и иммунологическая характеристика. Бактериология. 2026; 11(3): 19–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-19-25

High-molecular-weight glycoconjugate of *Haemophilus influenzae* type b native polysaccharide with CRM197 carrier protein: preparation and physicochemical and immunological characterization

P.A.Stryakhnin, P.G.Aparin, S.V.Korobova, I.Yu.Kurbatova, B.I.Alkhazova, V.A.Ledov

National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia, Moscow, Russian Federation

Objective. To obtain a soluble conjugate of native high-molecular-weight polyribosylribitol phosphate (PRP) from *Haemophilus influenzae* type b with a non-toxic mutant diphtheria toxin, the CRM197 protein, without prior depolymerization of the PRP and to evaluate its physicochemical, antigenic, and immunogenic properties.

Для корреспонденции:

Стряхнин Пётр Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Адрес: 115522, Москва, Каширское шоссе, 24

Статья поступила 01.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Petr A. Stryakhnin, Junior Researcher, Laboratory of Polysaccharide Vaccines, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

Address: 24 Kashirskoye highway, Moscow, 115522, Russian Federation

The article was received 01.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

Materials and methods. Native PRP was conjugated to the CRM197 protein. The product was purified on Sephacryl S-300 and characterized by size-exclusion HPLC with refractometric detection. The content of PRP, protein, nucleic acids, and bacterial endotoxins were determined using appropriate analytical methods. The integrity of antigenic determinants was assessed using direct and competitive ELISA. The immunogenicity of the PRP-CRM197 conjugate was studied in rabbits. The protective properties of the immune response to PRF-CRM197 were assessed by the survival rate of laboratory animals (mice) immunized with the conjugate after experimental infection with *H. influenzae* type b.
Results. A water-soluble PRF-CRM197 conjugate was obtained. The mass ratio of PRF to CRM197 in the purified sample was 1:1. The nucleic acid content did not exceed 0.1%, and the bacterial endotoxin content was 7 EU/mg. Direct and competitive ELISA confirmed the integrity of the antigenic determinants of PRF and CRM197. After booster immunization of rabbits, an increase in Hib-specific IgG antibody titers was observed. Mice immunized with PRF-CRM197 had higher survival after infection than control groups.
Conclusion. Direct CDAP conjugation of native high-molecular-weight PRP with CRM197 yields a highly purified, safe, and soluble glycoconjugate that retains the antigenic properties of both components and exhibits immunogenicity in animal models.
Key words: Haemophilus influenzae type b, polyribosylribitol phosphate, CRM197, glycoconjugate, CDAP, size-exclusion HPLC, ELISA, immunogenicity, vaccination

For citation: Stryakhnin P.A., Aparin P.G., Korobova S.V., Kurbatova I.Yu., Alkhazova B.I., Ledov V.A. High-molecular-weight glycoconjugate of *Haemophilus influenzae* type b native polysaccharide with CRM197 carrier protein: preparation and physicochemical and immunological characterization. Bacteriology. 2026; 11(3): 19–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-19-25

Капсульный полирибозилрибитолфосфат (ПРФ) *Haemophilus influenzae* типа b является основным антигеном Hib-вакцин. На ПРФ располагаются эпитопы для протективных антител. Антитела, индуцированные ПРФ-конъюгированными вакцинами, обладают высокой бактерицидной активностью [1]. Вместе с тем свободный ПРФ относится к Т-независимым антигенам и характеризуется недостаточной иммуногенностью у детей раннего возраста [2]. Для усиления иммунного ответа полисахарид ковалентно связывают с белками-носителями. Одним из наиболее широко применяемых носителей является CRM197 – нетоксичный вариант дифтерийного токсина [3, 4].

Физико-химические и иммуногенные свойства гликоконъюгатов зависят от нескольких взаимосвязанных параметров: структуры и длины углеводной цепи, способа ее активации, характеристик белка-носителя, соотношения полисахаридного и белкового компонентов, молекулярно-массового распределения продукта и доступности углеводных эпитопов [5–7]. Влияние каждого из этих факторов не является универсальным. Так, при исследовании ПРФ-олигосахаридов, содержавших в среднем 4, 6, 7 или 12 повторяющихся звеньев и унитерминально – только одним концом – связанных с CRM197, величина антительного ответа зависела не только от длины цепи, но и от степени коэффициента конъюгации белка с олигосахаридом [8].

В большинстве способов получения ПРФ-конъюгатов с CRM197 ПРФ предварительно подвергают контролируемой деполимеризации, после чего выделяют олигосахаридные или низкомолекулярные фракции и связывают их с белком-носителем [5, 8–11]. Использование укороченных цепей облегчает проведение реакции, очистку и стандартизацию продукта. Однако деполимеризация изменяет распределение полисахарида по длине цепей, уменьшает число повторяющихся звеньев в одной молекуле и увеличивает относительное содержание концевых групп. Поэтому результаты, полученные для олигосахаридных конъюгатов, нельзя без дополнительной проверки переносить на конъюгаты, содержащие нативный высокомолекулярный ПРФ.

Сохранение исходной длины полисахаридной цепи представляет альтернативный подход к получению ПРФ-гликоконъюгата. При активации ПРФ 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом реакционноспособные группы образуются на гидроксильных группах полисахарида и могут взаимодействовать с ε-аминогруппами лизиновых остатков белка без введения спейсера [12, 13]. Наличие нескольких потенциальных участков связывания вдоль протяженной цепи допускает образование высокомолекулярных белково-полисахаридных структур.

Работа с нативным высокомолекулярным ПРФ связана с технологическими сложностями. Многоточечное связывание может сопровождаться расширением молекулярно-массового распределения, образованием агрегатов и затруднением очистки от непрореагировавших компонентов. Поэтому сохранение высокой молекулярной массы ПРФ требует экспериментального подтверждения растворимости полученного продукта, определения его состава и молекулярно-размерных характеристик, а также оценки сохранности антигенных детерминант ПРФ и CRM197 [6, 11, 14, 15].

Ранее нами был разработан способ получения очищенного ПРФ *H. influenzae* типа b, пригодного для последующей конъюгации с белком-носителем [16]. В настоящей работе использовали нативный ПРФ со средневзвешенной молекулярной массой ~80 кДа, не подвергавшийся целенаправленной деполимеризации. Полисахарид активировали 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) и непосредственно связывали с CRM197, после чего продукт очищали эксклюзионной хроматографией. Полученный конъюгат исследовали физико-химическими и иммунохимическими методами, а его иммуногенные свойства оценивали на лабораторных животных.

Целью работы было получение растворимого конъюгата нативного высокомолекулярного ПРФ *H. influenzae* типа b с CRM197 без предварительной деполимеризации полисахарида, определение его состава и молекулярно-размерных характеристик, а также оценка сохранности антигенных детерминант, его иммуногенности и протективности иммунного ответа.

Материалы и методы

Культивирование H. influenzae типа b и получение ПРФ

Штамм *H. influenzae* 326 перед выращиванием в ферментере рассевали на твердую питательную среду на основе сердечно-мозгового бульона, содержащую 4 мг/л НАД и

10 мг/л гемина, для контроля морфологических свойств и чистоты культуры. Затем бактериальную культуру переносили в 350 мл жидкой питательной среды и выращивали 10–12 ч при 37°С. Полученной посевной культурой засевали ферментер рабочим объемом 10 л. Подлинность и чистоту инокулята подтверждали агглютинацией с Hib-специфической антисывороткой и окрашиванием по Граму.

ПРФ получали из культуральной жидкости по ранее описанной многостадийной схеме [16]. Культуральную жидкость центрифугировали при 12 000 g и 7°С в течение 60 мин, супернатант концентрировали тангенциальной ультрафильтрацией на мембранах с номинальным пределом отсечения 50 кДа («Владисарт»). Для удаления нуклеиновых кислот и белков проводили последовательную обработку эндонуклеазой, проназой Е, трипсином типа I и наргазой с последующей ультрафильтрацией. ПРФ осаждали цетавлоном по модифицированному методу Kuo [17]. Высокая степень очистки полисахарида была ранее подтверждена методом протонной ЯМР-спектроскопии [16, 18, 19]. Средневзвешенная молекулярная масса ПРФ составляла ~80 кДа.

Конъюгация ПРФ с CRM197

В качестве белка-носителя применяли CRM197 с молекулярной массой ~58,4 кДа [3, 4]. Гидроксильные группы полисахаридной цепи активировали CDAP [12, 13]. Реакцию останавливали добавлением глицина до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали смесь 60 мин при 20°С.

Очистка конъюгата ПРФ-CRM197

Реакционную смесь очищали методом колоночной хроматографии низкого давления на Sephacryl S-300. Образец объемом 10 мл наносили на колонку и элюировали 0,2 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) со скоростью 10 мл/ч. Элюат собирали фракциями по 10 мл. Во фракциях определяли содержание белкового и полисахаридного компонентов; фракции, соответствовавшие высокомолекулярной области и одновременно содержавшие ПРФ и CRM197, объединяли.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Молекулярно-размерные характеристики очищенного конъюгата определяли на хроматографической системе Agilent 1260 Infinity II, оснащенной рефрактометрическим детектором. Разделение проводили на колонке Tosoh G-5000PWxl в изократическом режиме [14, 20, 21]. В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М ФСБ с pH ~7,4. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин, объем вводимого образца – 100 мкл. Калибровочную зависимость строили по стандартам декстранов с молекулярной массой 2000, 670 и 70 кДа.

Количественное определение компонентов и примесей

Содержание полисахаридного компонента определяли по количеству рибозы орциновым методом в соответствии с ОФС 1.2.3.0019.15 ГФ XIV РФ. Содержание белка определяли с помощью набора QuantiTMBCA Assay Kit (Sigma). Содержание нуклеиновых кислот определяли методом Спирина согласно ОФС 1.7.2.0018.15 ГФ XIV РФ.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов

Содержание бактериальных эндотоксинов в очищенном конъюгате определяли количественным ЛАЛ-тестом [22, 23]. Результат выражали в единицах эндотоксина на 1 мг конъюгата.

Оценка пирогенности

Пирогенность препарата оценивали отдельно на кроликах в соответствии с ОФС 1.2.4.0005.15 ГФ XIV РФ. Животным вводили препарат в дозе, соответствовавшей 1 мкг ПРФ на 1 кг массы тела, и регистрировали изменение температуры тела.

Получение гипериммунной сыворотки кролика к H. influenzae типа b

Кроликов породы шиншилла массой 2–2,5 кг предварительно исследовали на наличие нормальных антител к *H. influenzae*. Животных иммунизировали прогретой культурой *H. influenzae*, штамм 267. Через 2 нед. проводили три повторных цикла иммунизации живой культурой. По завершении цикла животных обескровливали и получали сыворотку.

Определение специфической активности в конкурентном иммуноферментном_анализе (ИФА)

На твердую фазу сорбировали конъюгат ПРФ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в концентрации 1 мкг/мл по ПРФ в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе в течение 12–18 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т). В лунки вносили последовательные разведения ПРФ от 100 до 0,75 мкг/мл либо конъюгата ПРФ-CRM197 совместно с гипериммунной сывороткой кролика к ПРФ в 1%-м растворе БСА в ФСБ-Т. После инкубации в течение 1 ч при 37°С планшеты отмывали и вносили меченные пероксидазой антитела козы к IgG кролика (Sigma). После повторной инкубации и отмывки добавляли тетраметилбензидин (ТМБ). Через 15 мин реакцию останавливали 10%-м раствором серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Прямой ИФА для определения связывания антител с ПРФ и CRM197

Конъюгат ПРФ-CRM197 сорбировали на твердую фазу в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе в течение 12–18 ч при комнатной температуре. После отмывки ФСБ-Т вносили стандартную сыворотку человека 09/222 (NIBSC), содержащую антитела к ПРФ, в разведении 1:100 либо отрицательную сыворотку человека; моноклональные антитела к *H. influenzae* clone 1079/457 и clone 1079/83 (Bio-Rad) либо мышиные моноклональные антитела к антигену CD7 человека [24]; поликлональную сыворотку кролика к дифтерийному токсину ab151222 (Abcam) либо сыворотку интактного кролика. После инкубации в течение 1 ч при 37°С планшеты отмывали и вносили соответствующие антитела: меченные пероксидазой антитела к IgG человека, мыши или кролика (Sigma). Реакцию проявляли ТМБ, останавливали 10%-м раствором серной кислоты и учитывали при 450 нм.

Иммунизация кроликов и определение Hib-специфических IgG-антител

Кроликам породы шиншилла дважды с интервалом 14 суток внутримышечно вводили конъюгат ПРФ-CRM197 в физиологическом растворе в дозе 10 мкг по ПРФ на животное. Кровь из краевой вены уха отбирали до иммунизации, на 14-е сутки после первого введения, а также на 14-е и 39-е сутки после второго введения.

Для определения титров антител на твердую фазу сорбировали ПРФ-БСА в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе в течение 12–18 ч при комнатной температуре. После отмывки ФСБ-Т вносили двукратные разведения сывороток, начиная с 1:25. Связавшиеся IgG-антитела выяв-

ляли соответствующим конъюгатом антител, меченным пероксидазой (Sigma), с последующим использованием ТМБ. Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Оценка выживаемости иммунизированных мышей после экспериментального заражения H. influenzae типа b

Исследование проводили в соответствии с рекомендациями [25]. Мышей линии C57BL/6 (самцы) распределяли на 3 группы по 6 животных: контрольную, получавшую двукратно внутримышечно по 0,5 мл 0,9%-го раствора NaCl; опытную, получавшую двукратно по 0,5 мл конъюгата ПРФ-CRM197; группу препарата сравнения, получавшую двукратно по 0,5 мл вакцины Хиберикс®. Доза ПРФ в опытной группе и группе сравнения составляла 10 мкг на животное.

Через 14 суток после повторной иммунизации, на 29-е сутки после первого введения, мышей внутрибрюшинно заражали *H. influenzae* типа b. В отдельных опытах каждому животному вводили $4{\cdot}10^4$, $4{\cdot}10^5$ или $4{\cdot}10^6$ КОЕ в объеме 0,5 мл. За состоянием животных в первые сутки наблюдали постоянно, в последующие 14 суток – ежедневно. Результат выражали долей выживших животных от исходного числа в каждой группе.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение и физико-химическая характеристика конъюгата ПРФ-CRM197

В результате CDAP-опосредованной конъюгации нативного высокомолекулярного ПРФ *H. influenzae* типа b с белком-носителем CRM197 был получен водорастворимый белково-полисахаридный комплекс. После очистки препарат представлял собой прозрачный раствор без видимого осадка.

Хроматография низкого давления на Sephacryl S-300 обеспечивала отделение целевого высокомолекулярного продукта от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси и свободного белка-носителя. Фракции, одновременно содержавшие ПРФ и CRM197, объединяли.

По данным эксклюзионной ВЭЖХ (рис. 1) с рефрактометрическим детектированием очищенный образец характеризовался доминирующей высокомолекулярной фракцией. Основной пик элюировался в диапазоне 11,22–20,86 мин, максимальное время удерживания составляло 17,36 мин. Расчетное значение молекулярной массы в максимуме распределения основной фракции, определенное по калибровке декстранами, составляло 318 кДа. Полученное значение превышало молекулярную массу исходного ПРФ и CRM197,

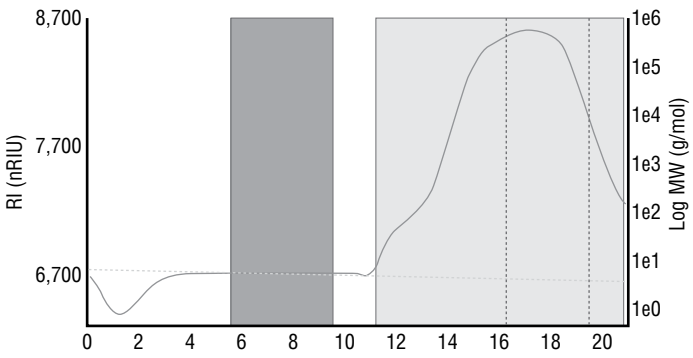


Рис. 1. **Хроматограмма конъюгата ПРФ-CRM197.**
Fig. 1. ***Chromatogram of the PRF-CRM197 conjugate.***

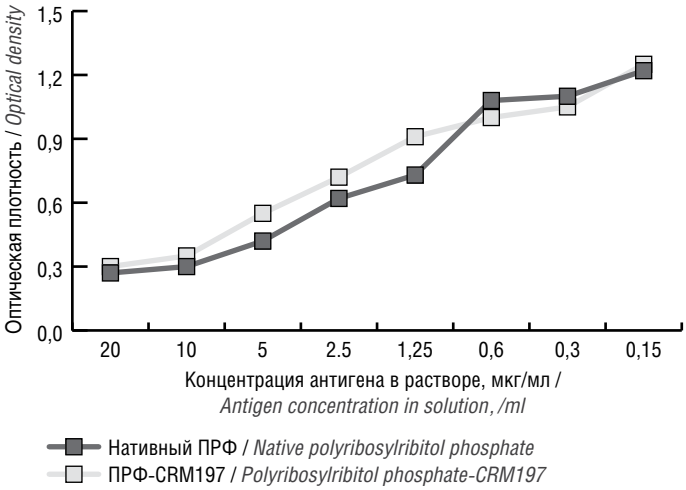


Рис. 2. **Реакция торможения в ИФА нативного ПРФ и конъюгата ПРФ-CRM197 с гипериммунной сывороткой кролика, содержащей антитела к *H. influenzae* типа b.**
Fig. 2. ***Inhibition reaction in an ELISA involving native PRP and a PRP-CRM197 conjugate, using rabbit hyperimmune serum containing antibodies against H. influenzae type b.***

что согласуется с образованием высокомолекулярного белково-полисахаридного продукта.

Количественное определение ПРФ и CRM197 в конъюгате показало, что их массовое соотношение в очищенном образце составляло 1:1. Содержание нуклеиновых кислот в очищенном конъюгате не превышало 0,1%.

Бактериальные эндотоксины и пирогенность

Содержание бактериальных эндотоксинов в очищенном конъюгате, определенное количественным ЛАЛ-тестом, составляло 7 ЭЕ/мг. В отдельном испытании на пирогенность суммарное повышение температуры тела кроликов после введения препарата составляло 0,1°С.

Иммунохимическая активность конъюгата ПРФ-CRM197

Торможение связывания ПРФ-специфических антител с сорбированным на твердой фазе ПРФ оценивали в конкурентном ИФА с использованием очищенного нативного ПРФ и конъюгата ПРФ-CRM197. Показано, что нативный ПРФ и ПРФ в составе конъюгата вызывали концентрационно-зависимое торможение связывания антител. С уменьшением концентрации растворимого антигена оптическая плотность возрастала. Кривые, полученные для нативного ПРФ и конъюгата ПРФ-CRM197, практически совпадали, что свидетельствует о сохранении распознаваемых антигенных детерминант ПРФ после конъюгации (рис. 2).

В прямом ИФА исследовали связывание специфических антител к полисахаридным и белковым компонентами конъюгата. Результаты представлены в табл. 1.

Оптическая плотность в лунках, где использовались специфические антитела, превышала оптическую плотность соответствующих отрицательных контролей в 3,8–13,8 раза. Полученные данные подтверждают специфическое распознавание как ПРФ, так и CRM197 в составе конъюгата и сохранность соответствующих антигенных детерминант после конъюгации.

Иммуногенность конъюгата ПРФ-CRM197

Для определения иммуногенности конъюгата ПРФ-CRM197 животных (кроликов) иммунизировали дважды с интервалом 2 нед. Наличие антител определяли после каж-

Таблица 1. **Связывание антител с ПРФ *H. influenzae* типа b и CRM197 в прямом ИФА**
Table 1. ***Antibody binding to H. influenzae type b PRP and CRM197 in direct ELISA***

Антитела / *Antibodies*	ОП отрицательный контроль / *OD Negative control*	ОП специфические антитела / *OD specific antibodies*
Референсная сыворотка человека, содержащая антитела к Hib (NIBSC) / *Human reference serum containing antibodies to Hib (NIBSC)*	0,570	2,385
Моноклональные антитела clone 1079/457 к *H. influenzae* (Bio-Rad) / *Monoclonal antibodies (clone 1079/457) against H. influenzae (Bio-Rad)*	0,078	1,080
Моноклональные антитела clone 1079/83 к *H. influenzae* (Bio-Rad) / *Monoclonal antibodies, clone 1079/83, against H. influenzae (Bio-Rad)*	0,078	0,296
Поликлональная сыворотка кролика, содержащая антитела к дифтерийному токсину (Abcam) / *Rabbit polyclonal serum containing antibodies against diphtheria toxin (Abcam)*	0,228	1,706

Таблица 2. **Титры антител к ПРФ *H. influenzae* типа b у кроликов, иммунизированных конъюгатом ПРФ-CRM197**
Table 2. ***Antibody titers to H. influenzae type b PRF in rabbits immunized with the PRF-CRM197 conjugate***

Животное / *Animal*	Первая иммунизация, 14-е сутки / *First immunization, day 14*	Вторая иммунизация, 14-е сутки / *Second immunization, day 14*	Вторая иммунизация, 39-е сутки / *Second immunization, day 39*
Кролик 1	1:50	1:200	1:25
Кролик 2	1:200	1:400	1:200
Кролик 3	1:25	1:200	1:100

дого введения. Показано, что ПРФ-специфические IgG-антитела обнаруживаются уже после первого введения конъюгата. На 14-е сутки после повторной иммунизации у всех трех животных титры антител были выше, чем после первого введения (табл. 2).

Таким образом, уже первое введение конъюгата ПРФ-CRM197 индуцировало образование ПРФ-специфических антител, а повторное сопровождалось повышением титров и выраженным буст-эффектом.

Протективные свойства иммунного ответа, вызванного иммунизацией конъюгатом ПРФ-CRM197

Для оценки способности конъюгата ПРФ-CRM197 индуцировать протективный иммунный ответ животных (мышей линии C57BL/6) предварительно двукратно иммунизировали ПРФ-CRM197. Далее проводили заражение различными дозами бактериями *H. influenzae* типа b и определяли выживаемость животных. Группами сравнения служили интактные мыши и мыши, которым вводилась коммерческая вакцина Хиберикс® (табл. 3).

После заражения дозой $4 \cdot 10^5$ КОЕ на животное в контрольной группе выживших животных не было, тогда как в группах ПРФ-CRM197 и Хиберикс® выживаемость составляла 50%. При увеличении инфицирующей дозы до $4 \cdot 10^6$ КОЕ смертность в контрольной группе достигала 100%, а в обеих иммунизированных группах – 83,3%, что соответствовало выживаемости 16,7%. При дозе $4 \cdot 10^4$ КОЕ выживаемость составляла 16,7% в контрольной группе и 66,7% в обеих иммунизированных группах. Таким образом, иммунизация ПРФ-CRM197 приводила к формированию иммунного ответа, сравнимого по эффективности с ответом на одобренный в клинической практике вакцинный препарат Хиберикс® и способного достоверно защитить от заражения бактериями *H. influenzae* типа b.

Обсуждение

Капсульный ПРФ *H. influenzae* типа b содержит углеводные эпитопы, определяющие специфичность антительного ответа, однако в свободной форме относится к Т-независимым антигенам и недостаточно эффективно индуцирует иммунитет у детей раннего возраста [2, 19, 26, 27]. Ковалентное связывание ПРФ с белком-носителем позволяет перевести иммунный ответ на Т-зависимый путь и сформировать стойкий гуморальный ответ с формированием клеток памяти.

Ранее при получении конъюгатов ПРФ с белком CRM197 применяли олигосахаридный подход. ПРФ подвергали контролируемому гидролизу, выделяли фрагменты заданной длины и затем связывали их с CRM197. Недостатком этого метода является то, что в процессе гидролиза могут повреждаться конформационные эпитопы [8–11].

Поэтому нами была проведена работа по получению конъюгата на основе нативного ПРФ. Был использован нативный ПРФ со средневзвешенной молекулярной массой ~80 кДа без предварительной деполимеризации. При CDAP-активации реакционноспособные группы формируются вдоль полисахаридной цепи, что создает возможность многоточечного связывания с белком-носителем [12, 13].

Выбранные условия конъюгации позволили получить растворимый продукт без видимого осадка. Расчетное значение молекулярной массы в максимуме распределения основной фракции, определенное по калибровке декстранами, составляло 318 кДа. Оно превышало молекулярную

Таблица 3. **Выживаемость мышей после двукратной иммунизации и экспериментального заражения *H. influenzae* типа b**
Table 3. ***Survival of mice following two-dose immunization and experimental infection with H. influenzae type b***

Группа / *Group*	Доза препарата / *Dose of preparation*	$4 \cdot 10^4$ КОЕ на животное / *$4 \cdot 10^4$ CFU per animal*	$4 \cdot 10^5$ КОЕ на животное / *$4 \cdot 10^5$ CFU per animal*	$4 \cdot 10^6$ КОЕ на животное / *$4 \cdot 10^6$ CFU per animal*
Контроль / *Control (n = 6)*	0,9% NaCl	16,7%	0%	0%
ПРФ-CRM197 (*n* = 6)	10 мкг ПРФ на животное / *10 μg PRF per animal*	66,7%	50%	16,7%
Хиберикс® (*n* = 6)	10 мкг ПРФ на животное / *10 μg PRF per animal*	66,7%	50%	16,7%

массу исходных компонентов и согласовывалось с образованием высокомолекулярного белково-полисахаридного продукта. Применяемый для подтверждения конъюгации метод эксклюзионной ВЭЖХ позволяет оценить лишь молекулярно-массовое распределение продукта, но не предоставляет информации о конформации антигенных детерминант [20, 28]. Поэтому сохранность антигенных детерминант ПРФ была подтверждена по их способности связываться с ПРФ-специфическими моно- и поликлональными антителами. Таким образом, проведенная химическая модификация не приводила к снижению распознавания антигенных детерминант ПРФ в составе конъюгата, что свидетельствует об их сохранности в процессах выделения, конъюгации и очистки.

Полученный конъюгат также обладал хорошей иммуногенностью и вызывал образование высоких титров специфических антител у лабораторных животных (кроликов). Важным свойством препарата стало наличие буст-эффекта: отмечался рост титров антител после второго введения, что является признаком формирования вторичного иммунного ответа и иммунологической памяти, характерных для ПРФ-конъюгированных вакцин [26, 29, 30].

Индуцированные на ПРФ-CRM197 антитела были способны достоверно защищать лабораторных животных от развития инфекции при их экспериментальном заражении бактериями *H. influenzae* типа b.

Кроме того, низкое содержание эндотоксинов и отсутствие пирогенности свидетельствуют о безопасности конъюгата.

Таким образом, совокупность полученных данных показывает, что нативный высокомолекулярный ПРФ может быть использован для прямой CDAP-конъюгации с CRM197 без предварительной деполимеризации [5, 8].

Заключение

Разработанный на основе нативного высокомолекулярного ПРФ конъюгата ПРФ-CRM197 демонстрирует антигенную сохранность и высокую иммуногенность. Данный вакцинный кандидат обеспечивает Т-зависимый гуморальный ответ, формирование иммунологической памяти и протективную защиту от *H. influenzae* типа b на уровне коммерческого аналога. Полученные результаты позволяют рассматривать ПРФ-CRM197 как перспективную основу для дальнейшей разработки отечественной кандидатной Hib-вакцины [5, 8].

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках научно-производственной программы предприятия Гритвак.

Funding

This study was conducted as part of the research and production program of Gritvak LLC.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Akeda Y, Koizumi Y, Takanami Y, Sumino S, Hattori Y, Sugizaki K, et al. Comparison of serum bactericidal and antibody titers induced by two *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: A phase III randomized double-blind study. Vaccine. 2018 Mar 14;36(12):1528-1532. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.02.011
2. Cadoz M. Potential and limitations of polysaccharide vaccines in infancy. Vaccine. 1998;16(14-15):1391-1395. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00097-8
3. Shinefield HR. Overview of the development and current use of CRM197 conjugate vaccines for pediatric use. Vaccine. 2010;28(27):4335-4339. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.072
4. Bröker M, Costantino P, DeTora L, McIntosh EDG, Rappuoli R. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 (CRM197), a non-toxic mutant of diphtheria toxin: Use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. Biologicals. 2011;39(4):195-204. DOI: 10.1016/j.biologicals.2011.05.004
5. Rana R, Dalal J, Singh D, Kumar N, Hanif S, Joshi N, et al. Development and characterization of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths. Vaccine. 2015;33(23):2646-2654. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.031
6. Khatun F, Stephenson RJ, Toth I. An Overview of Structural Features of Antibacterial Glycoconjugate Vaccines That Influence Their Immunogenicity. Chemistry – A European Journal. 2017;23(18):4233-4254. DOI: 10.1002/chem.201603599
7. Wessels MR, Paoletti LC, Guttormsen HK, Michon F, D'Ambra AJ, Kasper DL. Structural properties of group B streptococcal type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. Infection and Immunity. 1998;66(5):2186-2192. DOI: 10.1128/IAI.66.5.2186-2192.1998
8. Anderson PW, Pichichero ME, Stein EC, Porcelli S, Betts RF, Connuck DM, et al. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group, and hapten

loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen unterminally coupled to the diphtheria protein CRM197. J Immunol. 1989 Apr 1;142(7):2464-8.

9. Anderson P, Pichichero ME, Insel RA. Immunogens consisting of oligosaccharides from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b coupled to diphtheria toxoid or the toxin protein CRM197. J of Clinical Investigation. 1985;76(1):52-59. DOI: 10.1172/JCI111976
10. Ravenscroft N, Averani G, Bartoloni A, Berti S, Bigio M, Carinci V, et al. Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccines. Vaccine. 1999 Jul 16;17(22):2802-16. DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00092-4
11. Bolgiano B, Mawas F, Yost SE, Crane DT, Lemercinier X, Corbel MJ. Effect of physico-chemical modification on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide–CRM197 conjugate vaccines. Vaccine. 2001;19(23–24):3189-3200. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00024-X
12. Lees A, Nelson BL, Mond JJ. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. Vaccine. 1996;14(3):190-198. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00195-7
13. Shafer DE, Toll B, Schuman RF, Nelson BL, Mond JJ, Lees A. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. Vaccine. 2000;18(13):1273-1281. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00370-9
14. Plumb JE, Yost SE. Molecular size characterization of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. Vaccine. 1996;14(5):399-404. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00202-C
15. Zhao J, Hu G, Huang Y, Huang Y, Wei X, Shi J. Polysaccharide conjugate vaccine: A kind of vaccine with great development potential. Chinese Chemical Letters. 2021;32(4):1331-1340. DOI: 10.1016/j.cclet.2020.10.013
16. Коробова СВ, Стряхнин ПА, Курбатова ИЮ, Казаков ИА, Разваляева НА, Анкудинов ИВ, и др. Получение и оценка качества полирибозилрибитолфосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции. Бактериология. 2023;8(3):75-82. / Korobova SV, Stryakhnin PA, Kurbatova IYu, Kazakov IA, Razvalyayeva NA, Ankudinov IV, et al. Development and quality evaluation of the *Haemophilus influenzae* type b polyribozyl-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection. Bacteriology. 2023;8(3):75-82. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-75-82 (In Russian).
17. Kuo J.-C. Isolation and purification of polyribosyl ribitol phosphate from Haemophilus influenzae type b. US4220717A. 1980.
18. Lemercinier X, Jones C. An NMR Spectroscopic Identity Test for the Control of the Capsular Polysaccharide from *Haemophilus influenzae* Type b. Biologicals. 2000;28(3):175-183. DOI: 10.1006/biol.2000.0255
19. World Health Organization. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series No 897. Annex 1. Geneva: WHO; 2000.
20. von Hunolstein C, Parisi L, Recchia S. A routine high-performance size-exclusion chromatography to determine molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Vaccine. 1999;17(2):118-125. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00166-2
21. Parisi L, von Hunolstein C. Determination of the molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b–tetanus toxoid conjugate vaccines by size-exclusion chromatography. Journal of Chromatography A. 1999;847(1-2):209-211. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00287-3
22. Ochiai M, Kataoka M, Toyoizumi H, Kamachi K, Yamamoto A, Horiuchi Y. Evaluation of endotoxin content of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined (DTaP) vaccines that interfere with the bacterial endotoxin test. Vaccine. 2003 May 16;21(17-18):1862-6. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00006-9
23. Di Paolo A, Forti K, Anzalone L, Corneli S, Pellegrini M, Severi G, et al. First evaluation of endotoxins in veterinary autogenous vaccines produced in Italy by LAL assay. Biologicals. 2018;55:71-73. DOI: 10.1016/j.biologicals.2018.06.001.
24. Филатов АВ, Бачурин ПС, Маркова НА, Сурнакова НЕ. Панель моноклональных антител против антигенов лимфоцитов человека. Экспериментальная онкология. 1989;11(2):28-32. / Filatov AV, Bachurin PS, Markova NA, Surnakova NE. Panel' monoklonal'nykh antitel protiv antigenov limfotsitov cheloveka. Eksperimental'naya onkologiya. 1989;11(2):28-32. (In Russian).
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2-я. М.: Гриф и К, 2012;135. / Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv (Immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). Chast' 2-ya. M.: Grif i K, 2012;135. (In Russian).
26. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Immunology. 2004;113(2):163-174. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004. 01971.x
27. Sun X, Stefanetti G, Berti F, Kasper DL. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2019;116(1):193-198. DOI: 10.1073/pnas.1816401115
28. Patkowski A, Bujalowski W, Chu B, Schneerson R, Robbins JB. Light-scattering spectroscopic study of polysaccharide protein conjugate. Biopolymers. 1982;21(8):1503-1520. DOI: 10.1002/bip.360210804
29. Granoff DM, Holmes SJ. Comparative immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. Vaccine. 1991;9(Suppl):S30-S34. DOI: 10.1016/0264-410X(91)90178-9
30. Nolan T, Altmann A, Skeljo M, Streeton C, Schuerman L. Antibody persistence, PRP-specific immune memory, and booster responses in infants immunised with a combination DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine. Vaccine. 2004;23(1):14-20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.06.017

Информация о соавторах:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России
ORCID: 0009-0005-3319-7668

Курбатова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории препаративной биохимии антигенов, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Ледов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, зав. лабораторией полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России
ORCID: 0000-0001-7899-2626

Алхазова Биана Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Information about co-authors:

Svetlana V. Korobova, PhD in Biological Sciences, senior scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia
ORCID: 0009-0005-3319-7668

Irina Yu. Kurbatova, PhD in Biological Sciences, senior scientist, laboratory of antigen preparative biochemistry, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

Vladimir A Ledov, PhD, MD, leading scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

Petr G. Aparin, MD, PhD, DSc, head of polysaccharide vaccines laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia
ORCID: 0000-0001-7899-2626

Biana I. Alkhazova, Junior Researcher, laboratory of Polysaccharide Vaccine, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 26–30
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 26–30

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-26-30

Сравнительный анализ биохимической активности природных и клинических штаммов микромицетов рода *Fusarium*

П.Е.Гуляев[1], С.А.Лисовская[1,2], Г.Ш.Исаева[1,2]

[1]ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация;
[2]ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация

Несмотря на традиционный статус грибов рода *Fusarium* как фитопатогенных организмов, в медицинской практике фиксируется стабильное увеличение ассоциированных с ними оппортунистических микозов. Возникновению таких патологий способствуют инволютивные изменения, дисфункции метаболизма, нерациональная антибиотикотерапия или применение супрессивных препаратов. Наиболее уязвимую группу формируют пациенты с дефицитом иммунной защиты, у которых высок риск генерализации процесса и развития фунгемии. Персистенция микромицетов и последующее поражение кожных покровов и слизистых субстратов обеспечиваются активацией их собственного патогенного потенциала в процессе колонизации. Проведенная оценка ферментативного профиля изолятов различного генеза выявила функциональную специализацию штаммов. Микромицеты, полученные из клинических образцов, проявляют выраженную деструктивную способность к субстратам животного происхождения. В свою очередь, изоляты из естественных экониш адаптированы к расщеплению растительных веществ, демонстрируя высокую амилазную активность.
Ключевые слова: Fusarium, микоз, микромицеты, биохимическая активность, субстрат, ферменты

Для цитирования: Гуляев П.Е., Лисовская С.А., Исаева Г.Ш. Сравнительный анализ биохимической активности природных и клинических штаммов микромицетов рода *Fusarium*. Бактериология. 2026; 11(3): 26–30. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-26-30

Comparative analysis of the biochemical activity of natural and clinical strains of micromycetes of the genus *Fusarium*

P.E.Gulyaev[1], S.A.Lisovskaya[1,2], G.S.Isaeva[1,2]

[1]Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;
[2]Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation

Despite the traditional status of *Fusarium* fungi as phytopathogenic organisms, a steady increase in associated opportunistic mycoses has been recorded in medical practice. The development of such pathologies is facilitated by involutional changes, metabolic dysfunctions, irrational antibiotic therapy, or the use of suppressive drugs. The most vulnerable group consists of patients with a deficient immune system, who are at high risk of generalization and the development of fungemia. The persistence of micromycetes and subsequent damage to the skin and mucous membranes are ensured by the activation of their own pathogenic potential during colonization. An evaluation of the enzymatic profile of isolates of various origins revealed functional specialization among the strains. Micromycetes obtained from clinical samples exhibit a pronounced destructive capacity for substrates of animal origin. In turn, isolates from external ecological niches are adapted to the breakdown of plant polymers, demonstrating high amylase activity.
Key words: Fusarium, mycosis, micromycetes, biochemical activity, substrate, enzymes

For citation: Gulyaev P.E., Lisovskaya S.A., Isaeva G.S. Comparative analysis of the biochemical activity of natural and clinical strains of micromycetes of the genus *Fusarium*. Bacteriology. 2026; 11(3): 26–30. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-26-30

В последние годы отмечается рост частоты инвазивных фузариозов, особенно среди пациентов с иммунодефицитными состояниями [1]. Изначально представителей рода *Fusarium* относили к фитопатогенам [2, 3], но в настоящее время показано, что они также способны вызывать широкий спектр поверхностных и системных инфекций человека с высокой заболеваемостью в первом случае и высокой смертностью во втором [4]. Уникальность рода заключается в его способности колонизировать крайне разнородные субстраты: объекты окружающей среды (растения, почва, водная среда) и биотопы человека (кожа, ногти, слизистые оболочки), что свидетельствует о высокой адаптивной пластичности и разнообразии метаболического аппарата [5–7].

Для корреспонденции:

Гуляев Павел Евгеньевич, старший преподаватель кафедры микробиологии им. академика В.М.Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

Статья поступила 22.03.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Pavel E. Gulyaev, Senior lecturer at the Academician V.M.Aristovsky Department of Microbiology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia

Address: 49 Butlerov street, Kazan, 420012, Russian Federation

The article was received 22.03.2026, accepted for publication 30.09.2026

Ключевым фактором вирулентности рода *Fusarium* является их способность продуцировать различные экзоферменты и вторичные метаболиты. Богатая ферментативная система данных микромицетов, включающая протеазы, липазы, казеиназы, альбуминазы, целлюлазы и другие гидролазы, способна обеспечивать трофические потребности гриба, а также играет решающую роль в преодолении защитных барьеров макроорганизма, деструкции тканей и обеспечении инвазивного роста [8]. Вторичные метаболиты, такие как трихотеценовые микотоксины, оказывают иммуносупрессивное [9] и цитотоксическое действие.

В настоящее время накоплены многочисленные данные о том, что штаммы одного и того же вида, но выделенные из разных экологических ниш (природные и клинические), могут существенно различаться по своему биохимическому потенциалу, вирулентности и паттернам антибиотикорезистентности. Это позволяет предположить, что происхождение изолята является важным фактором, определяющим его метаболическую стратегию. Однако систематические сравнительные исследования, направленные на выявление корреляции между экологическим происхождением изолятов *Fusarium* и особенностями их биохимической активности, проводятся недостаточно полно.

Целью настоящего исследования является выявление значимых различий в ключевых биохимических активностях между клиническими и природными штаммами *Fusarium* spp. В фокусе анализа находятся гемолитическая, амилазная и фосфолипазная активности, которые потенциально могут служить маркерами вирулентности. Полученные данные позволят углубить понимание молекулярных механизмов патогенеза фузариозов.

Материалы и методы

Методологическая основа работы построена на сравнительном анализе 19 изолятов грибов *Fusarium* spp., дифференцированных на две группы: клинические штаммы (n = 9) и штаммы, выделенные из объектов естественной среды (n = 10). Эксперименты выполнялись на базе микологической лаборатории ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора. Сбор биологического материала осуществлялся при наличии подписанного пациентами информированного согласия и с официального одобрения локального этического комитета данного учреждения (протокол №2 от 15.03.2023).

Источником клинических изолятов послужили субстраты от лиц с манифестными признаками поражения кожных покровов и слизистых оболочек различной локализации. Снятие экссудата из цервикального канала, зева и конъюнктивальной полости выполняли стерильными ватными тупферами с их последующим переносом в индивидуальные пробирки. Эпидермальные чешуйки извлекали путем соскабливания скальпелем по периферии очага воспаления, а при онихомикозах образцы отбирали из глубоких структур измененной ногтевой пластины. Сбор материала и его транспортировка в лабораторию осуществлялся в стерильной лабораторной посуде (лабораторные пробирки, чашки Петри).

Первичный микроскопический скрининг нативных препаратов и культуральное исследование дублировали для каждого образца с параллельной инкубацией посевов в двух фиксированных температурных режимах (28°C и 37°C). Все верифицированные клинические штаммы микромицетов были переданы на депонирование в Российскую коллекцию патогенных грибов (РКПГ) при НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И.Мечникова» Минздрава России.

В качестве природных изолятов использовали коллекционные штаммы, полученные из ВКМ: *Fusarium oxysporum* (F-140, F-2639), *Fusarium solani* (F-142), *Fusarium chlamydosporum* (F-3945), *Fusarium sporotrichioides* (F-4971, F-4972), *Fusarium proliferatum* (F-4996, F-4997), *Fusarium verticillioides* (F-5015, F-671).

Статистический анализ проводили с использованием программы IBM® SPSS® Statistics. Для оценки статистической значимости различий в группах использовался t-критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$. Нормальность распределения проверялась при помощи критерия Шапиро–Уилка ($p \leq 0{,}05$).

Выделение и идентификация грибов

Первичное культуральное исследование выполняли с применением двух параллельных подходов. В первом случае осуществляли приготовление серийных разведений биоматериала от 10^1 до 10^6 в стерильном 0,9%-м растворе хлорида натрия с последующим внесением 0,1 мл полученной взвеси на плотную среду Сабуро-мальтоза-агар (производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Для предотвращения сопутствующей бактериальной контаминации в состав среды предварительно вносили хлорамфеникол (HiMedia, Индия) в концентрации 50 МЕ. Второй подход предполагал прямой посев нативного материала без предварительного разведения в три точки на поверхность агара. Рост колоний микромицетов в двух или трех зонах инокуляции расценивали как клинически значимый результат, тогда как единичный очаг роста интерпретировали как случайное загрязнение.

Видовую идентификацию выделенных изолятов проводили на основании макроморфологических свойств (характеристика колоний, характер пигментообразования мицелия и реверса) [10, 11] и микроскопических характеристик (наличие септ, морфология воздушного и субстратного мицелия, особенности конидиогенеза). Для подтверждения данных, полученных путем фенотипического исследования, дополнительно применяли молекулярно-генетический метод. Для исключения возможной транзиторной контаминации, у пациентов, у которых при первичном посеве были выделены грибы рода *Fusarium* в двух повторениях, проводили повторный забор и посев биоматериала через 5–7 дней.

Для идентификации изолятов *Fusarium* spp. было проведено амплифицирование участка гена элонгационного фактора трансляции 1-альфа (TEF1-α) с использованием праймеров TEF1 (ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC) и TEF2 (GGA(G/A) GTACCAGT(G/C)ATCATGTT) [12, 13]. ДНК выделяли из мицелия с использованием набора Monarch Nucleic Acid Purification Kit (New England) согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем 1×буфер, 200 мкМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,5 U Taq-полимеразы Thermo Fisher Scientific и 20–50 нг геномной ДНК. Амплификацию выполняли при следующих условиях: начальная денатурация

95°C – 5 мин; затем 30 циклов (95°C – 60 с, 57°C – 75 с, 72°C – 60 с); финальное удлинение 72°C – 10 мин. Амплифицированные фрагменты (~600 п.н.) проверяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле и очищали с использованием набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Секвенирование проводили методом Sanger с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) и капиллярного секвенатора ABI 3500. Полученные последовательности идентифицировали с помощью базы данных FUSARIUM-ID. Статистический анализ проводили с использованием программы IBM® SPSS® Statistics.

Определение фосфолипазной активности

Оценку суммарной способности микромицетов к секреции фосфолипаз проводили с помощью модифицированного «чашечного метода» по методике Price et al. [14]. Принцип выявления активности заключается в ферментативной деградации липидных компонентов яичного желтка, приводящей к высвобождению жирных кислот и последующему формированию нерастворимых кальциевых комплексов в толще агара.

Для постановки теста использовали селективную среду на основе агара Сабуро, дополненную 1М хлорида натрия, 5 mM хлорида кальция и 8% гомогенизированного стерильного желтка куриного яйца. Инкубацию посевов осуществляли в стационарных условиях термостата при температуре 30 ± 1°C в течение 5–7 суток. По завершении периода культивирования проводили измерение двух параметров: диаметра колонии (Дк) и суммарного диаметра колонии вместе с окружающей зоной преципитации (Д(к + зп)) [15]. Индекс фосфолипазной активности рассчитывали по формуле: индекс активности ферментов = Д(к + зп) / Дк (рис. 1).

Определение амилолитической активности

Изучение амилолитической активности проводили на агаризованной среде с добавлением крахмала (растворимый крахмал, K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, пептон, дрожжевой автолизат, агар) [9]. Посевы инкубировали в течение 3–7 суток при 30 ± 2°C, ежедневно контролируя рост и появление зон просветления вокруг колоний. Амилолитическую активность оценивали по гидролизу крахмала, который обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет [16].

Определение гемолитической активности

Для изучения гемолитических свойств использовали синтетическую питательную среду (K_2HPO_4, $MgSO_4$, агар) с добавлением 2,5% гемоглобина. Посевы инкубировали в течение 3–7 суток при 30 ± 2°C, ежедневно контролируя рост и появление зон просветления вокруг колоний. Индекс гемолитической активности рассчитывали по той же формуле, что и фосфолипазную активность (рис. 2).

Результаты исследования и их обсуждение

Способность грибов к утилизации тех или иных субстратов может являться фактором вирулентности. В связи с этим проведена сравнительная оценка ферментативной активности клинических и референсных коллекционных штаммов *Fusarium* spp.

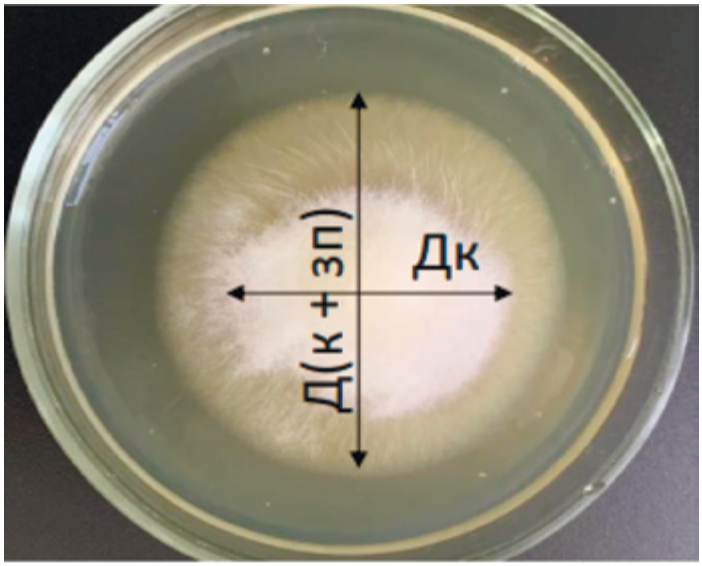


Рис. 1. **Формула расчета индекса активности ферментов.**
Fig. 1. ***Formula for calculating the enzyme activity index.***

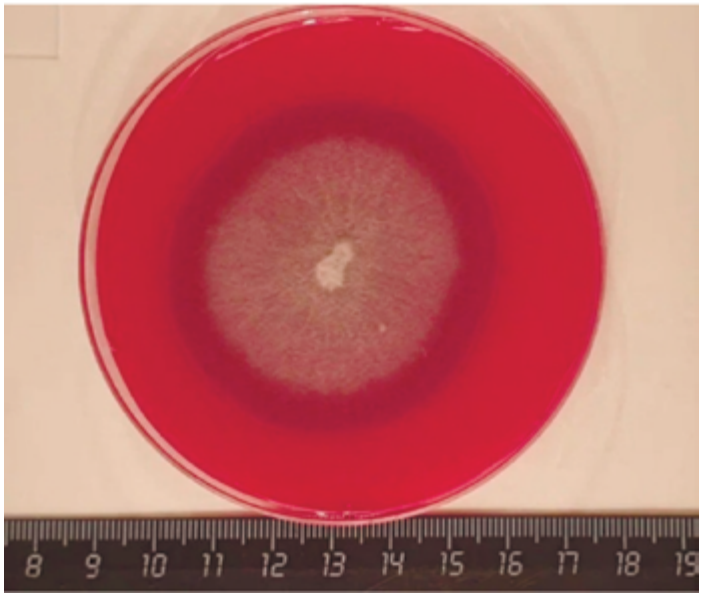


Рис. 2. **Гемолитическая активность клинического штамма 1612.**
Fig. 2. ***Hemolytic activity of clinical strain 1612.***

Изучение ферментативной активности коллекционных штаммов *Fusarium* spp., выделенных из окружающей среды, показало отсутствие выраженной гемолитической, амилолитической и фосфолипазной активности (рис. 3). Индекс активности для всех изученных штаммов не превышал 1,4.

Клинические штаммы *Fusarium* spp., напротив, проявляли гемолитическую активность – средний индекс варьировал в пределах 1,2 (рис. 4).

Однако амилолитическая активность по сравнению с природными штаммами была выражена значительнее слабее. При оценке фосфолипазной активности были выявлены некоторые штаммовые различия: изоляты 1612, 5666 и 1515 отличались несколько более выраженной способностью к утилизации фосфолипидов по сравнению с другими клиническими и природными штаммами ($p < 0,01$).

В ходе проведения экспериментов по оценке ферментативных свойств *Fusarium* spp. отмечено, что на среде с добавлением яичного желтка у всех клинических штаммов наблюдался ускоренный рост с образованием быстрорастущего

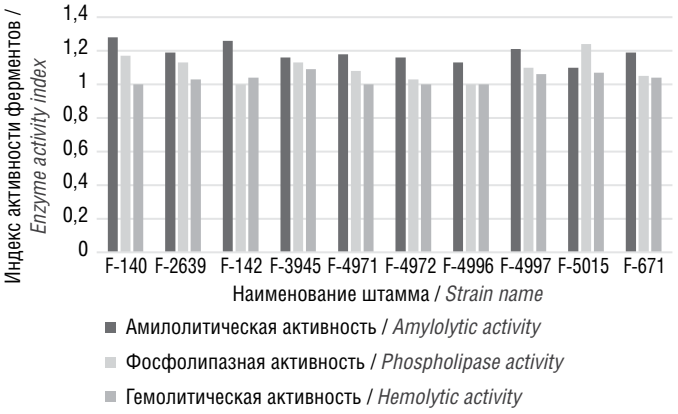


Рис. 3. **Ферментативная активность природных штаммов *Fusarium* spp.**
Fig. 3. ***Enzymatic activity of natural strains of Fusarium spp.***

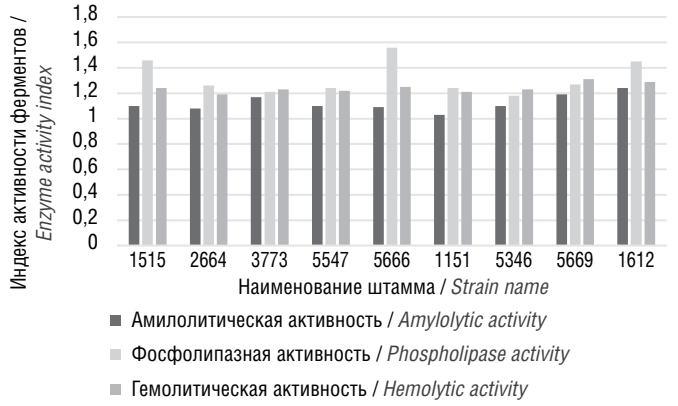


Рис. 4. **Ферментативная активность клинических штаммов *Fusarium* spp.**
Fig. 4. ***Enzymatic activity of clinical strains of Fusarium spp.***

воздушного мицелия и микроконидий, в то время как у природных изолятов наблюдалось образование хламидоспор.

Результаты свидетельствуют о специфических биохимических адаптациях штаммов *Fusarium*, зависящих от источника выделения. Повышенные фосфолипазная и гемолитическая активности клинических штаммов объясняются наличием инвазивных свойств и потребностью в расщеплении субстрата для поддержания роста в организме хозяина.

Заключение

Проведенное исследование выявило статистически значимые различия в биохимической активности между клиническими и природными штаммами грибов рода *Fusarium*. Эти различия подтверждают специфическую адаптацию патогенных изолятов к условиям макроорганизма. Данные результаты согласуются с целью исследования по выявлению различий в ключевых ферментативных активностях.

У клинических штаммов *Fusarium* обнаружено преобладание гемолитической и фосфолипазной активностей. Эти ферменты идентифицированы как ключевые детерминанты вирулентности, способствующие инвазии тканей и уклонению от иммунного ответа. Эти изменения свидетельствуют о метаболическом сдвиге в сторону паразитического существования и формировании устойчивых патогенных фенотипов. Выявленные особенности биохимической активности объясняют повышенную патогенность клинических изолятов. Полученные данные имеют важное значение как для понимания механизмов патогенности *Fusarium* spp., так и для разработки новых подходов к диагностике и лечению инфекций, вызванных этими грибами.

Источники финансирования

Работа выполнена при поддержке отраслевой научной программы Роспотребнадзора.

Funding

The work was carried out with the support of the industry scientific program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Буркутбаева ТН, Фохридина ЛИ, Тастанбекова ЛК. Свойства плесневых грибов, выделенных от больных с микозами ЛОР-органов. Проблемы медицинской микологии. 2006;8(1):37-39.
2. Гагкаева ТЮ, Гаврилова ОП, Левитин ММ. Биоразнообразие и ареалы основных токсинопродуцирующих грибов рода Fusarium. Биосфера. 2014;6(1):36-45.
3. Salah H, Al-Hatmi AM, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, van Diepeningen AD, et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. J Infect. 2015 Dec;71(6):658-66. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.08.011

4. Tupaki-Sreepurna A, Kindo AJ. Fusarium: The versatile pathogen. Indian J Med Microbiol. 2018 Jan-Mar;36(1):8-17. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_16_24
5. Домрачева Л, Трефилова Л, Фокина А. Фузарии: биологический контроль, сорбционные возможности [Текст]. Германия: Изд-во LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013;181.
6. Walter S, Nicholson P, Doohan FM. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. New Phytol. 2010 Jan;185(1):54-66. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x
7. Охапкина ВЮ, Ханжин АА. Эколого-эпидемиологическое значение микромицетов рода *Fusarium*. Теоретическая и прикладная экология. 2012;2:5-14.
8. Çuhadar T, Karabıçak N, Özdil T, Özgür D, Otağ F, Hızel K, et al. Detection of virulence factors and antifungal susceptibilities of *Fusarium* strains isolated from keratitis cases. Mikrobiyol Bul. 2018 Jul;52(3):247-258. doi: 10.5578/mb.66738 (Turkish).
9. Short DP, O'Donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH, et al. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. Fungal Genet Biol. 2013 Apr;53:59-70. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.01.004
10. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Laboratory approach to the diagnosis of fungal infections. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams, Philadelphia: 2006;1156-1166.
11. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2014 Feb;70(2):338-51. DOI: 10.1016/j.jaad.2013.10.010
12. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2044-9. DOI: 10.1073/pnas.95.5.2044
13. Torres-Cruz TJ, Whitaker BK, Proctor RH, Broders K, Laraba I, Kim HS, et al. FUSARIUM-ID v.3.0: An Updated, Downloadable Resource for *Fusarium* Species Identification. Plant Dis. 2022 Jun;106(6):1610-1616. DOI: 10.1094/PDIS-09-21-2105-SR
14. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982 Mar;20(1):7-14. DOI: 10.1080/00362178285380031
15. Кузикова ИЛ, Медведева НГ, Сухаревич ВИ. Влияние фунгицидов и поверхностно-активных веществ на фосфолипазную активность грибов – агентов биоповреждений. Микология и фитопатология. 2010;44(5):441-447.
16. Василова ЛЯ, Хидиятова АА, Борисенков АГ. Скрининг микроорганизмов – продуцентов амилаз. Башкирский химический журнал. 2018;25(4):30-33.

References

1. Burkutbayeva TN, Fokhrydyna LI, Tastanbyekova LK. Properties of the mould fungi isolated from patients with mycoses of LOR-organs. Problems of Medical Mycology. 2006;8(1):37-39. (In Russian).
2. Gagkaeva TYu, Gavrilova OP, Levitin MM. Biodiversity and distribution of the main toxigenic *Fusarium* fungi. Biosfera. 2014;6(1):36-45. (In Russian).
3. Salah H, Al-Hatmi AM, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, van Diepeningen AD, et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. J Infect. 2015 Dec;71(6):658-66. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.08.011
4. Tupaki-Sreepurna A, Kindo AJ. Fusarium: The versatile pathogen. Indian J Med Microbiol. 2018 Jan-Mar;36(1):8-17. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_16_24
5. Domracheva L, Trefilova L, Fokina A. *Fusaria*: biological control, sorption capabilities. Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013;181. (In Russian).
6. Walter S, Nicholson P, Doohan FM. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. New Phytol. 2010 Jan;185(1):54-66. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x
7. Okhapkina VYu, Khanzhin AA. Ecological epidemiological significance of micromycetes of the genus *Fusarium*. Theoretical and applied ecology. 2012;2:5-14. (In Russian).
8. Çuhadar T, Karabıçak N, Özdil T, Özgür D, Otağ F, Hızel K, et al. Detection of virulence factors and antifungal susceptibilities of *Fusarium* strains isolated from keratitis cases. Mikrobiyol Bul. 2018 Jul;52(3):247-258. doi: 10.5578/mb.66738 (Turkish).
9. Short DP, O'Donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH, et al. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. Fungal Genet Biol. 2013 Apr;53:59-70. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.01.004
10. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Laboratory approach to the diagnosis of fungal infections. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams, Philadelphia: 2006;1156-1166.
11. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2014 Feb;70(2):338-51. DOI: 10.1016/j.jaad.2013.10.010
12. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2044-9. DOI: 10.1073/pnas.95.5.2044
13. Torres-Cruz TJ, Whitaker BK, Proctor RH, Broders K, Laraba I, Kim HS, et al. FUSARIUM-ID v.3.0: An Updated, Downloadable Resource for *Fusarium* Species Identification. Plant Dis. 2022 Jun;106(6):1610-1616. DOI: 10.1094/PDIS-09-21-2105-SR
14. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982 Mar;20(1):7-14. DOI: 10.1080/00362178285380031
15. Kuzikova IL, Medvedeva NG, Sukharevich VI. Influence of fungicides and surfactants on phospholipase activity of biodestructive fungi. Mycology and Phytopathology. 2010;44(5):441-447. (In Russian).
16. Vasilova LYa, Khidiyatova AA, Borisenkov AG. Screening of microorganisms – producers of amylase. Bashkir Chemical Journal. 2018;25(4):30-33. (In Russian).

Информация о соавторах:

Лисовская Светлана Анатольевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии им. акад. В.М.Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; ведущий научный сотрудник лаборатории микологии ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-4377-2567

Исаева Гузель Шавхатовна, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии им. Акад. В.М.Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; заместитель директора по инновационному развитию ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1462-8734

Information about co-authors:

Svetlana A. Lisovskaya, PhD, MD, Associate Professor of the Academician V.M.Aristovsky Department of Microbiology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia; Leading Researcher of Mycology laboratory, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-4377-2567

Guzel Sh. Isaeva, MD, PhD, DSc, Head of the Academician V.M.Aristovsky Department of Microbiology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia; deputy Director for Innovative Development, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1462-8734

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-31-38

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 31–38
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 31–38

Сравнительная оценка токсичности и иммуногенности панели рекомбинантных белков бруцелл *in vivo*

В.И.Дятлова, Т.В.Гапельченкова, В.А.Казаков, С.В.Дентовская

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

Рост заболеваемости бруцеллезом среди населения диктует необходимость совершенствования мер специфической профилактики. Создание безопасной и эффективной противобруцеллезной вакцины для человека остается актуальной задачей глобальной биомедицины. Современные подходы, основанные на достижениях геномики, протеомики и биоинформатики, успешно применяются для разработки профилактических средств нового поколения.
В настоящем исследовании проведена доклиническая оценка безопасности и иммуногенности 40 рекомбинантных белков-кандидатов в противобруцеллезные вакцины, полученных с использованием инновационных технологий. Скрининг выполняли на мышах линии BALB/c методами гистологического, биохимического, гематологического и иммуноферментного (ИФА) анализов.
По результатам ИФА все антигены индуцировали выраженный специфический иммунный ответ. На основании комплексного анализа параметров безопасности и иммуногенности отобраны 35 белков, перспективных для дальнейших испытаний протективной эффективности.
Ключевые слова: бруцеллез, белки, токсичность, гистология, мыши, антитела

Для цитирования: Дятлова В.И., Гапельченкова Т.В., Казаков В.А., Дентовская С.В. Сравнительная оценка токсичности и иммуногенности панели рекомбинантных белков бруцелл *in vivo*. Бактериология. 2026; 11(3): 31–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-31-38

Comparative in vivo evaluation of toxicity and immunogenicity of a panel of recombinant brucella proteins

V.I.Dyatlova, T.V.Gapelchenkova, V.A.Kazakov, S.V.Dentovskaya

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

The rising incidence of brucellosis among the population underscores the urgent need to improve specific prevention measures. Developing a safe and effective human brucellosis vaccine remains a critical challenge in global biomedicine. Advanced approaches in genomics, proteomics, and bioinformatics are successfully utilized to design next-generation prophylactic agents. This study presents a preclinical evaluation of the safety and immunogenicity of 40 recombinant protein candidates for brucellosis vaccines, developed using innovative technologies. Screening was performed on BALB/c mice using histological, biochemical, hematological, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. According to the ELISA results, all antigens induced a robust specific immune response. Based on a comprehensive safety and immunogenicity analysis, 35 promising proteins were selected for further protective efficacy trials.
Key words: brucellosis, proteins, toxicity, histology, mice, antibodies

For citation: Dyatlova V.I., Gapelchenkova T.V., Kazakov V.A., Dentovskaya S.V. Comparative in vivo evaluation of toxicity and immunogenicity of a panel of recombinant brucella proteins. Bacteriology. 2026; 11(3): 31–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-31-38

Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, старший 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) 36-0003
E-mail: dyatlovav@obolensk.org

Статья поступила 15.06.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, PhD, MD, Senior Researcher, Plague Microbiology Laboratory, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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

The article was received 15.06.2026, accepted for publication 30.09.2026

© Издательство «Династия», 2026
Тел./факс: +7 (495) 660-6004, e-mail: red@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru

Согласно актуальным эпидемиологическим данным, ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации за последние четыре года оценивается как неустойчивая с тенденцией к росту заболеваемости. Увеличение числа случаев инфекции среди населения происходит на фоне стабильно высокой энзоотичности по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота в регионах юга Сибири и европейской части страны. Одним из ключевых факторов, способствующих формированию новых неблагополучных очагов, является недостаточная эффективность комплекса профилактических мероприятий среди групп риска [1]. В настоящее время плановая вакцинация людей против бруцеллеза проводится исключительно по эпидемическим показаниям, что обусловлено высокой реактогенностью и ограниченной безопасностью применяемых живых вакцин.

Современные подходы к конструированию вакцин с использованием достижений геномики, протеомики и биоинформатики позволяют оперативно разрабатывать и внедрять в производство профилактические препараты, лишенные недостатков традиционных живых вакцин. В рамках настоящего исследования методами компьютерного моделирования и обратной вакцинологии нами были определены, спроектированы и получены рекомбинантные бруцеллезные белки, обладающие высоким вакцинным потенциалом. Наряду с протективностью важнейшей характеристикой любой вакцины является ее экспериментально доказанная безопасность. Биотестирование на модельных животных в стандартизированных условиях является одним из наиболее объективных методов оценки безвредности новых фармакологических препаратов [2]. В ходе таких исследований фиксируются изменения ключевых тест-параметров (внешний вид, поведенческие реакции, выживаемость, плодовитость, масса тела, показатели крови, морфологическое состояние органов) в ответ на введение препарата. Чаще всего в доклинических испытаниях используют лабораторных мышей, что обусловлено их уникальной биологической схожестью с человеком, компактными размерами, экономичностью содержания и высокой скоростью размножения. Ранее на базе нашей лаборатории была разработана модель бруцеллеза на мышах линии BALB/c. Применение данной модели позволило в течение 56 суток комплексно изучить динамику инфекции, включая мониторинг массы тела, патогистологический анализ, оценку бактериальной обсемененности паренхиматозных органов и лабораторные показатели крови [3]. В настоящей работе исследовано влияние 40 рекомбинантных бруцеллезных белков, обладающих вакцинным потенциалом, на здоровых животных. Для обеспечения сопоставимости результатов использовали аналогичную линию мышей и спектр методических подходов для оценки их физиологического статуса.

Целью данной работы являлась оценка иммуногенности и токсичности 40 перспективных рекомбинантных белков бруцелл на мышах линии BALB/c для отбора наиболее безопасных кандидатов для дальнейшего исследования их протективной эффективности.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Эксперименты проводили на 164 самках мышей линии BALB/c (H2d) в возрасте 6–8 нед. и массой 15–20 г, полученных из филиала «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание животных и уход за ними осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментального исследования одобрен биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № ВП-2024/7 от 06.11.2024). Период наблюдения за животными составил 15 суток.

Рекомбинантные белки. 40 рекомбинантных бруцеллезных белков (таблица) были получены в экспрессионной системе *E. coli* (в штаммах SHuffle T7, BL21(DE3) и BL21(DE3) pLysS, трансформированных плазмидами pACYCduet-1, pET22b, pET24b, pET28b и pET32b с генами целевых белков) под индукцией изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и селективным давлением антибиотиков (ампициллин, канамицин, хлорамфеникол). Очистку проводили методом металл-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях. С целью оптимизации экспрессии, устранения токсических свойств и повышения иммуногенности белков были проведены следующие генетические модификации: замена кодонов в нуклеотидных последовательностях, кодирующих токсичные пептиды в составе нескольких белков (OMP16, OMP31, LptD, rHRA1, rBigB); конструирование слитого гена, состоящего из последовательностей трех бруцеллезных белков (OMP25d-OMP19-OMP10); введение в плазмиду pACYCduet-1 второго бруцеллезного гена для коэкспрессии LptD с шапероном LptE и др.

Иммунизация животных. Животных разделили на 40 опытных групп и 1 контрольную группу (по $n = 4$ в каждой). Мышам опытных групп однократно подкожно вводили исследуемые белки в дозе 20 мкг, адсорбированные на 15 мкг гидроксида алюминия в 200 мкл фосфатно-солевого буфера. Животные контрольной группы оставались интактными.

Эвтаназия и вскрытие лабораторных животных, отбор материала. Через 24 ч и 14 суток после иммунизации по две мыши из каждой группы выводили из эксперимента путем ингаляции CO_2. При вскрытии отбирали органы для гистологического исследования, а также кровь для общего, биохимического и иммунологического анализов. Для получения сыворотки кровь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем центрифугировали (5000 g, 10 мин). Полученную сыворотку переносили в стерильные пробирки, аликвотировали и хранили при -86°C.

Оценка соматического статуса животных. По программе ежедневного клинического мониторинга проводили общий и физикальный осмотр животных. В ходе осмотра оценивали внешний вид, степень упитанности, особенности поведения и наличие признаков болевого синдрома. Контроль динамики массы тела осуществляли путем ежедневного взвешивания.

ИФА. Уровень специфических антител в сыворотках мышей определяли методом непрямого ИФА. Планшеты сенсибилизировали рекомбинантными белками (6 мкг/лунку в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6). Свободные сайты связывания блокировали 1% раствором БСА в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Промывку на всех этапах осуществляли четырехкратно ФСБ с 0,05% Твин-20. Исследуемые и контрольные сыворотки титровали от 1:100

Таблица. **Оценка токсичности и иммуногенности рекомбинантных белков**
Table. ***Assessment of toxicity and immunogenicity of recombinant proteins***

Белки	Прирост веса, г.	Биохимия		Гистология		P	Титры антител (1:x)		
		2-е сутки	14-е сутки	2-е сутки	14-е сутки		IgGAM	IgG1	IgG2a
BtaF	1,7	glu↓	glob↓ast↑glu↓	CM	–	5	200	400	100
OmpA	2	bun↑glu↓	–	–	–	2	400	400	3200
FliC	-0,5	–	glob↓ glu↓tc↑	–	–	3	800	3200	400
VirB1	0,85	ast↑	ggt↑ tc↑ glob↓	B	–	5	100	200	0
LptE	-0,6	–	glob↓	–	–	3	100	400	100
BtaE	1,4	bun↑	glob↓, tp↓	–	–	3	400	200	100
Omp10	1	ast↑ glu↓	glob↓	MLTA	–	4	100	100	800
rHRA1	1,3	bun↑	ast↑	–	–	2	100	100	1600
TonB	2,5	–	glob↓ tc↑	–	CM	3	200	200	400
VirB5	1,8	glob↓	glob↓	MTA	–	3	100	1600	800
OMP28	1,7	glob↓	–	–	–	1	400	200	400
BAB2_314	2,6	glob↓	–	B, CM	HC	4	100	0	100
L9	1,2	glob↓ tba↑	glob↓ tc↑	–	–	4	100	100	100
Omp25d	1,55	glob↓	ast↑ Cl–↓	–	PMI	4	100	200	0
TolC	0,3	–	glu↓	–	–	1	100	100	100
SP41	1,4	–	tba ↑	–	–	1	0	200	0
rBigB	2,5	glu↓	–	–	–	1	800	800	600
BigB	1,3	ast↑ glu↑	alb↓	LI	–	4	400	800	800
OmpW	3,8	glob↓ bun↑	glob↓	–	–	3	800	100	0
LptD	1	–	–	CM	–	1	800	400	2000
Tig	0,62	–	–	–	–	0	400	3200	800
Omp25c	–0,1	glu↑	–	–	–	1	400	1600	1600
Omp2b	1,8	glu↑	–	–	–	3	400	1600	100
FlgE	1,5	glu↑	–	–	–	1	100	3200	100
Lp	2	glu↑	–	–	–	1	0	100	100
SP29	2,6	glu↑	ldh↑	–	–	3	0	100	0
MliC	1,3		–	–	–	0	100	400	400
LppA	3	glu↑	–	–	–	1	100	100	200
SOD	3,6	glu↑	–	–	–	1	100	200	0
BLS	0,25	–	glob↓glu↑	–	–	2	200	3200	0
L7/L12	1,25	ast↑ glu↑	ldh↑	–	–	4	100	100	0
OmpE	2,45	ast↑bun↑glu↑	ldh↑	–	–	2	400	800	400
Omp19	0,85	ast↑ glu↑	–	–	–	2	400	3200	800
rOMP16	-0,1	alb↓ ast↑	glob↓	MI	–	4	100	800	400
OMP16	-3,2	alb↓ ast↑	glob↓ tba↑	–	B AI	9	100	400	400
VirB8	2,5	ast↑ ldh↑	alt↑ ldh↑	N PMI HS MI	–	7	800	3200	3200
OMP31	-1,15	alb↓alt↑ast↑	glob↓	MNI	B	7	100	100	800
FlgH	1,6	alt↑ast↑ glu↑ bun↑	alb↓glu↑Cl↑ tba↑	B	G	9	0	100	100
IalB	0,25	ast↑alt↑glu↑	Na+↑	AL	EMH G	7	100	400	100
Omp25d- Omp19-Omp10	2,1	alb↓glob↓	–	–	–	2	800	3200	3200

до 1:3200. Специфическое связывание выявляли с помощью козьих антител против IgGAM, IgG1 и IgG2a мыши, меченных пероксидазой хрена (Abclonal, Elabscience, США; 1:5000). В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин (ТМБ; «Хема», Россия); реакцию останавливали 0,5 М H_2SO_4. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на спектрофотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия)».

Гематологические исследования. Общий клинический анализ крови выполняли на ветеринарном гематологическом анализаторе BC-5000Vet (Mindray, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Кровь для исследования отбирали в пробирки, содержащие антикоагулянт К3 ЭДТА.

Биохимические исследования. Биохимический анализ сыворотки крови проводили на автоматическом анализато-

ре vetXpert C5 (Mindray, Китай). Определение более 25 показателей (включая общий белок, активность ферментов и концентрацию электролитов) осуществляли с использованием специализированных диагностических дисков для комплексной экспресс-диагностики от того же производителя.

Гистологические исследования. Образцы печени, селезенки, тимуса и почек иммунизированных мышей фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. После вырезки и промывки в проточной водопроводной воде образцы дегидратировали в батарее этиловых спиртов восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты изучали методом световой микроскопии на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с помощью цифровой камеры высокого разрешения Axiocam 305 color (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Доклиническая оценка безопасности лечебных и профилактических препаратов направлена на выявление нежелательных побочных эффектов до начала клинических испытаний. В настоящей работе изучено токсическое и иммунотропное действие ряда рекомбинантных белков на организм мышей для исключения потенциально опасных кандидатов из дальнейших исследований. Поскольку предварительный теоретический анализ литературы и скрининг *in silico* не обнаружили у целевых белков летальных свойств, возникла необходимость экспериментальной верификации их безопасности на тест-системах *in vivo*. Руководствуясь стандартами ГОСТ 32296-2013, OECD 420, 423 и ОФС.1.1.1.0018.15 [4–7], мы разработали комплексный протокол оценки острой (24 ч) и отсроченной (14 сут.) токсичности при однократном введении мышам двукратной протективной дозы белка (20 мкг) сорбированного на гидроксиде алюминия. Выраженность токсического эффекта оценивали по разработанной балльной шкале. Критериями исключения животных из дальнейшего анализа являлись их гибель или превышение суммарного балла (P) > 6. Изменение каждого показателя оценивалось в 1 балл: снижение массы тела на каждый грамм; гистологические признаки гепато-, сплено-, нефро- или иммунотоксичности; местнораздражающее действие; поведенческие нарушения; гепатоспленомегалия; гиперферментемия; гиперкреатининемия или гипопротеинемия.

Результаты оценки соматического статуса животных

В ходе эксперимента летальных исходов и клинических признаков болевого синдрома у мышей не наблюдалось. На рис. 1 приведена схема изменения массы тела мышей линии BALB/c после иммунизации исследуемыми белками. Динамика массы тела в основном отражала физиологический прирост (0,25–3,8 г). Однако в группах OMP16, OMP31 и LptE зафиксировано статистически значимое снижение веса (-3,2 г, -1,15 г, -0,6 г соответственно). У мышей, иммунизированных OMP19, BLS и rHRA1, наблюдался транзиторный подъем массы тела с последующим снижением, что может быть связано с повышением аппетита или задержкой жидкости, учитывая иммуностимулирующие свойства двух белков [8, 9]. Генетическая детоксикация показала эффективность: нативный BigB вызывал временную потерю веса, тогда как рекомбинантный rBigB – стабильный прирост. Аналогично, нативный OMP16 выраженное снижение массы тела, начиная с 3-х суток, а модифицированный rOMP16 – нет. Снижение веса после 3 суток также отмечено в группе OMP25c. Таким образом, выявлены межгрупповые различия в динамике массы тела животных под влиянием различных белков. Однако ограниченная выборка и нестерильные условия содержания требуют осторожности при интерпретации данных из-за возможного влияния интеркуррентных факторов.

ИФА. Иммунологический анализ сывороток крови мышей выполняли как для оценки иммуногенности вводимых белковых препаратов, так и для подтверждения специфичности индуцированного ими биологического ответа. На 14-е сутки после иммунизации в каждой экспериментальной группе определяли титры суммарных антител трех классов (IgG, IgA, IgM-IgGAM), а также подклассов IgG1 и IgG2a против каждого из 40 антигенов. Соотношение подклассов IgG использовали для оценки направленности иммунного ответа: преобладание IgG2a свидетельствует о клеточном (Th1), а IgG1 – о гуморальном (Th2) компоненте. Результаты ИФА представлены в таблице. Наиболее выраженный суммарный иммунный ответ (IgGAM) зафиксирован к 6 белкам: VirB8, OMP25d-OMP19-OMP10, rBigB, FliC, LptD и OmpW. Клеточный иммунный ответ (по уровню IgG2a) преобладал для 10 антигенов (VirB8, OMP25d-OMP19-OMP10, rBigB, FliC, OMP25c, VirB5, BLS, FlgE, OMP19, OMP2b), тогда как гуморальный (по уровню IgG1) – для 6 (VirB8, OMP25d-OMP19-OMP10, OMP25c, LptD, OMPA, rHRA1). Выявление специфических антител в сыворотках крови опытных животных подтверждает иммуногенность исследуемых рекомбинантных белков и эффективность иммунизации.

Гематологические исследования. Токсические агенты способны оказывать выраженное негативное влияние на систему кроветворения [10]. Гематотоксичность может проявляться как на уровне костного мозга, так и на стадии зрелых клеток, приводя к развитию апластической или гемолитической анемии, нейтропении, агранулоцитоза, тромбоцитопении и коагулопатий. В настоящем исследовании общий анализ крови животных выполняли на 2-е и 14-е сутки после иммунизации белками. Целью данного иследования являлась оценка общего состояния организма, а также обнаружение возможного повреждающего действия исследуемых белков на клеточный состав крови. По результатам гематологического анализа ни в одной из опытных групп не было выявлено статистически значимых изменений количества основных форменных элементов (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов). Отсутствие сдвигов в лейкоцитарной формуле и стабильность пула клеток периферической крови свидетельствуют об отсутствии прямой гематотоксичности исследуемых белков и индуцированных ими острых патологических процессов в кроветворной системе.

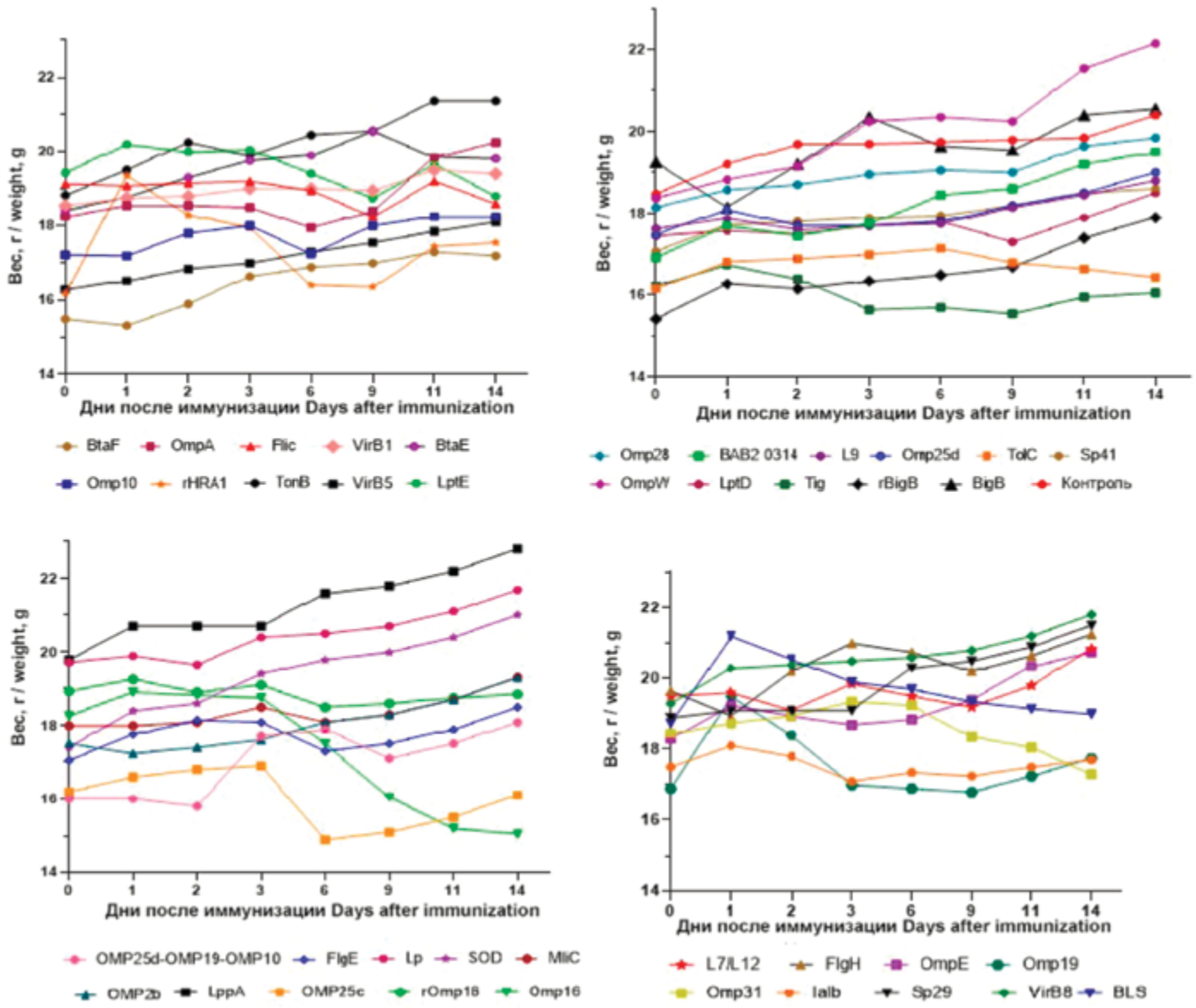


Рис. 1. **Динамика изменения веса мышей после иммунизации рекомбинантными белками.**
Fig. 1. ***Dynamics of changes in the weight of mice after immunization with recombinant proteins.***

Биохимические исследования. Оценка биохимических показателей сыворотки крови позволяет верифицировать латентные и косвенные признаки повреждения внутренних органов при токсической нагрузке [10]. Ключевыми маркерами системной интоксикации традиционно служат следующие патофизиологические сдвиги: гепатотоксичность – индуцированное повреждение паренхимы печени и холестатический синдром, которые регистрируют по гиперферментемии (росту активности аланинаминотрансферазы (alt), аспартатаминотрансферазы (ast), лактатдегидрогеназы (ldh), щелочной фосфатазы (alp), гамма-глутамилтрансферазы (ggt)), а также по уровню общего билирубина, желчных кислот (tba) и холестерина (tc); нефротоксичность – развитие почечной дисфункции, манифестирующее снижением скорости клубочковой фильтрации и ростом концентрации сывороточного креатинина (crea) и мочевины (bun); панкреатотоксичность – поражение ткани поджелудочной железы, критериями которого выступают повышение активности α-амилазы (amy) и глюкозы (glu); метаболические сдвиги-системные нарушения гомеостаза, выражающиеся в увеличении анионного промежутка (разницы между сывороточными катионами и анионами) как маркера метаболического ацидоза, а также в развитии гипопротеинемии (снижение общего белка (tp), альбумина (alb), глобулинов (glob)), отражающей угнетение белковосинтезирующей функции печени. Результаты биохимического анализа представлены в таблице.

В отличие от стабильных гематологических показателей, в биохимическом профиле сыворотки крови у ряда иммунизированных белками групп выявлен комплекс патологических изменений. На вторые сутки раннего постинъекционного периода системная реактивность проявлялась цитолитическим синдромом (ростом активности трансаминаз), что свидетельствовало о транзиторном повышении проницаемости плазматических мембран гепатоцитов. Также зафиксированы холестаз, азотемия и гипергликемия. Последняя развилась вследствие повреждения печени, поджелудочной железы либо как результат контринсулярного ответа гипоталамо-гипофизарной системы на стресс и токсическое воздействие. Сочетанное снижение концентраций альбумина и глобулинов

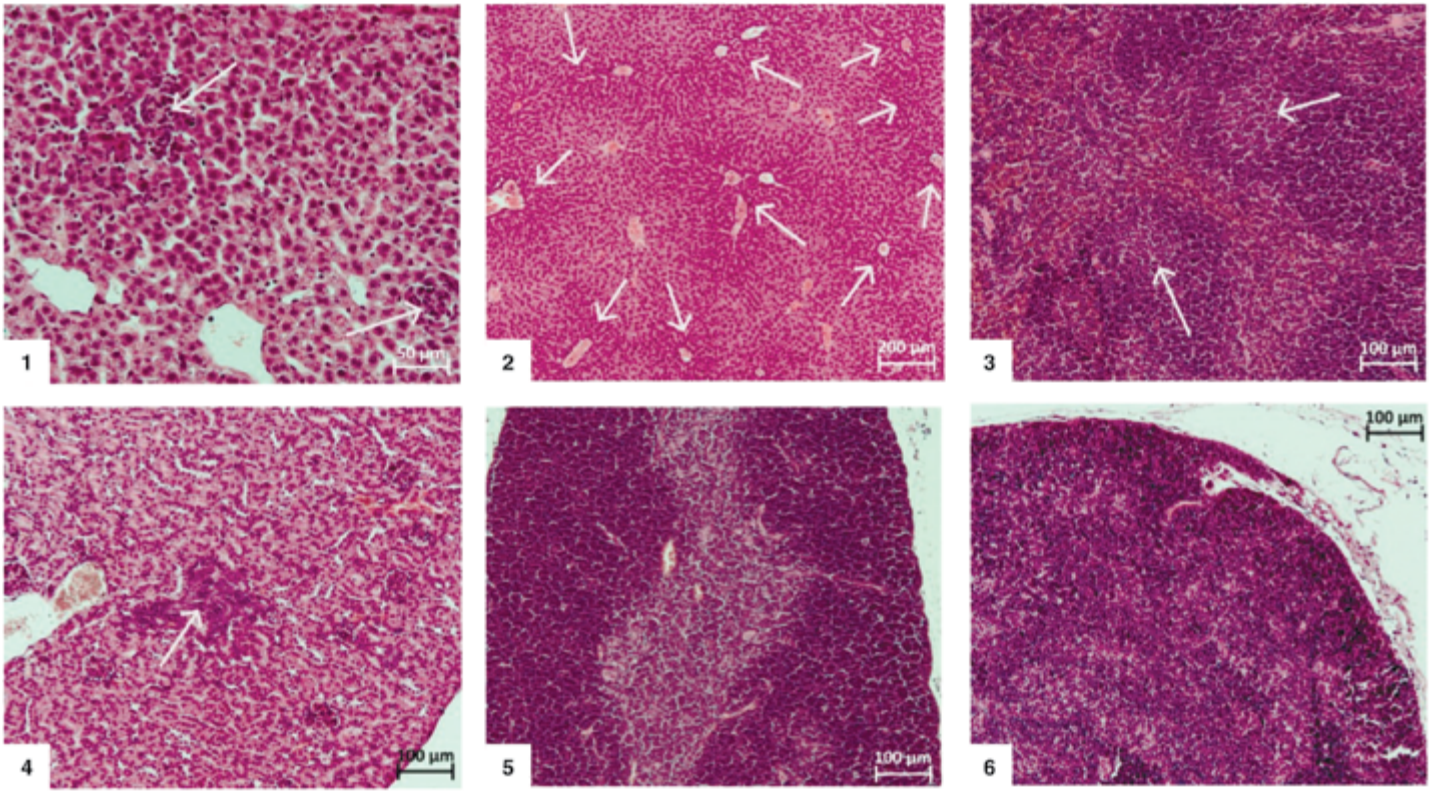


Рис. 2. **Гистологические препараты органов мышей, иммунизированных рекомбинантными белками: 1 – очаги нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации в местах некроза гепатоцитов в печени (стрелки), 2 – базофилия гепатоцитов в перипортальных зонах печени (стрелки), 3 – герминативные центры в лимфоидных фолликулах белой пульпы селезенки (стрелки), 4 – очаговая базофилия и мононуклеарная инфильтрация канальцев почек (стрелка), 5 – фрагмент интактного тимуса мыши, 6 – акцидентальная инволюция тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×100.**

*Fig. 2. **Histological preparations of organs of mice immunized with recombinant proteins: 1 – foci of neutrophilic and macrophage infiltration at the sites of hepatocyte necrosis in the liver (arrows), 2 – basophilia of hepatocytes in the periportal zones of the liver (arrows), 3 – germinal centers in the lymphoid follicles of the white pulp of the spleen (arrows), 4 – focal basophilia and mononuclear infiltration of the renal tubules (arrow), 5 – fragment of the intact mouse thymus, 6 – accidental involution of the thymus. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification ×100.***

в этот период, вероятно, было вызвано интерстициальной экссудацией из-за повышенной проницаемости капилляров, супрессией синтеза альбуминов гепатоцитами и расходом глобулинов на опсонизацию антигена. К 14-м суткам отмечен регресс метаболических нарушений с нормализацией активности трансаминаз и азотистого обмена, что указывает на обратимость процессов и отсутствие стойкой деструкции печени и почек. Сохраняющаяся гипоальбуминемия обусловлена метаболическим переключением гепатоцитов на продукцию белков острой фазы и специфических иммуноглобулинов. Снижение пула свободных глобулинов ассоциировано с их конъюгацией в циркулирующие иммунные комплексы в фазе манифестации гуморального иммунного ответа, что косвенно подтверждается результатами ИФА.

Гистологические исследования. Токсические повреждения внутренних органов выявляются как при макроскопическом осмотре, так и в ходе последующего гистологического анализа. Наиболее чувствительными к воздействию ксенобиотиков оказываются паренхиматозные органы, реагирующие увеличением размеров, а также изменением цвета и тканевой структуры [11]. Острая интоксикация вызывает комплекс патоморфологических изменений. В печени развиваются цитотоксический и холестатический эффекты: нарушение метаболизма и проницаемости мембран гепатоцитов приводит к жировому гепатозу, некрозу клеток и формированию воспалительных очагов с полиморфноклеточной инфильтрацией. Поражение селезенки проявляется гемостазом, отеком, гиперплазией лимфоидных узелков белой пульпы с активацией герминативных центров, а также скоплением сидерофагов в красной пульпе. В почках фиксируют дистрофические изменения, острый канальцевый некроз, интерстициальный нефрит, гломеруло- и артериолопатии. Токсическое воздействие на тимус индуцирует его структурную перестройку, приводящую к развитию вторичного иммунодефицита. При этом на начальном этапе стресс-реакции отмечается транзиторное увеличение органа за счет мобилизации защитных резервов, которое затем сменяется акцидентальной инволюцией с редукцией коркового вещества, падением плотности тимоцитов и разрушением дольчатого строения [12]. Микрофотографии гистологических препаратов, демонстрирующие выраженность описанных патологических изменений у мышей, представлены на рис. 2.

Анализ гистологической картины паренхиматозных и иммунокомпетентных органов животных в динамике выявил четкую стадийность развития токсического процесса, характеризующуюся переходом от острых адаптационно-компенсаторных реакций к деструктивным и органическим изменениям. На 2-е сутки после введения препаратов регистрировались признаки острого стресс-индуцированного и токсического воздействия. В тимусе отмечалась ранняя фаза клеточного ответа, проявляющаяся диффузным слабовыраженным (MLTA) или умеренным (MTA) апоптозом лимфоцитов в

корковом веществе долек при сохранении стабильного кортико-медуллярного отношения. В отдельных случаях фиксировалось транзиторное снижение данного показателя (CM), что свидетельствовало об активной миграции или ускоренной гибели лимфоидных клеток. Со стороны гепатобилиарной системы наблюдалась реактивная перипортальная базофилия гепатоцитов (B), отражающая компенсаторное напряжение белковосинтетической функции печени в ответ на ксеногенную нагрузку. В почечной паренхиме изменения носили преимущественно очаговый характер и ограничивались мелкими периваскулярными мононуклеарными инфильтратами (PMI). К 14-м суткам эксперимента у подопытных животных в ряде случаев отмечалась трансформация острой базофилии ткани печени в очаговый некроз гепатоцитов (N) и декомпенсированную крупнокапельную жировую дистрофию (HS). Прогрессирование воспалительной реакции подтверждалось формированием множественных макрофагально-нейтрофильных (MNI) и мононуклеарных (MI) инфильтратов. В качестве компенсаторного ответа на угнетение магистрального кроветворения в паренхиме печени верифицировались очаги экстрамедуллярного гемопоэза (EMH). В иммунокомпетентных органах к концу второй недели регистрировалась выраженная структурно-функциональная перестройка. В лимфоидных фолликулах белой пульпы селезенки активировались герминативные центры (G), что указывало на протекание интенсивного иммуногенеза. В тимусе регистрировался очаговый апоптоз лимфоцитов со стойким падением кортико-медуллярного отношения (AL), переходящий в акцидентальную инволюцию органа (AI). В мочевыделительной системе развивались признаки деструктивной нефропатии, проявляющиеся в виде экссудации белка с формированием гиалиновых масс в просвете почечных канальцев (HC) и лейкоцитарной инфильтрации лоханок (LI).

На основании комплексного скрининга, включающего интегральную балльную оценку, динамику массы тела, биохимические маркеры и результаты гистопатологического анализа, из дальнейшей разработки были выбракованы 5 рекомбинантных белков, продемонстрировавших высокий уровень токсичности:

OMP16 (9 баллов) вызвал системный токсикоз, истощение, цитолиз и гипоальбуминемию на фоне глубокого иммунотоксического действия с инволюцией тимуса и опустошением его лимфоидной популяции;

FlgH (9 баллов) продемонстрировал полиорганную агрессивность с развитием тяжелого гепаторенального синдрома, проявившегося нефротоксичностью, гипоальбуминемией и гепатотоксичностью с критическим подъемом трансаминаз;

VirB8 (7 баллов) проявил прямую деструктивную гепатотоксичность с массивным энзиматическим взрывом и морфологическими изменениями печени в виде очагового некроза, жировой дистрофии и воспаления;

OMP31 (7 баллов) селективно индуцировал в печени воспаление с макрофагальной и нейтрофильной инфильтрацией, потерей массы тела и падением уровня альбумина;

IalB (7 баллов) был исключен из-за высокой иммуно- и гематотоксичности, выразившейся в апоптозе лимфоцитов тимуса, запуске компенсаторного внекостномозгового кроветворения в печени и реактивной гиперплазии.

Заключение

Таким образом, на основании комплексной оценки безопасности и иммуногенности 40 рекомбинантных белков-кандидатов против бруцеллеза на мышах линии BALB/c для дальнейшего изучения протективной активности был отобран 35 перспективный антиген. Использование белков OMP16, FlgH, VirB8, OMP31 и IalB в составе вакцинных препаратов признано нецелесообразным.

Источники финансирования

Работа выполнена по теме НИОКР М 2.3 в рамках государственного задания.

Funding

The work was carried out on the topic of R & D M 2.3 within the framework of a state assignment

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Работа с животными

Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦПМБ (№ ВП-2024/7 от 06.11.2024).

Animal Work

All animal work was conducted in accordance with GOST 33216-2014 "Guidelines for the Care and Maintenance of Laboratory Animals." The animal experiment protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Scientific Center for Preventive Medical Research (No VP-2024/7 dated November 6, 2024).

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Пономаренко ДГ, Матвиенко АД, Хачатурова АА, Жаринова ИВ, Скударева ОН, Транквилевский ДВ, и др. Анализ ситуации по бруцеллезу в мире и Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;2:36-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50
2. Биотестирование: методические указания по выполнению лабораторных работ. Сост.: Борисова СД. Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2015.
3. Дятлова ВИ, Гапельченкова ТВ, Казаков ВА, Дентовская СВ. Моделирование бруцеллеза у мышей в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2. Бактериология. 2025;10(4):47-51. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-47-51
4. ГОСТ 32296-2013. Межгосударственный стандарт. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. М., Стандартинформ, 2019.
5. «ОФС.1.1.1.0018. Общая фармакопейная статья. Аномальная токсичность» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 11.04.2025 N 188) («Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание») [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://internet-law.ru/documents/prod/gosudarstvennaya-farmakopeya/0/ofs_1_75262.html?ysclid=mseln33mhi578759234 (дата обращения 04.08.2026).
6. OECD (2002), Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264070943-en
7. OECD (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264071001-en
8. Risso GS, Carabajal MV, Bruno LA, Ibañez AE, Coria LM, Pasquevich KA, et al. U-Omp19 from *Brucella abortus* Is a Useful Adjuvant for Vaccine Formulations against *Salmonella* Infection in Mice. Front Immunol. 2017 Feb 17;8:171. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00171
9. Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. Microbes Infect. 2006 Apr;8(5):1277-86. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.006
10. Куценко СА. Основы токсикологии: научное издание. СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2004.
11. Егоров АН, Гольдерова АС, Троев ИП. Гистологическая оценка токсичности экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* на печень и почки мышей линии ICR. Международный научно-исследовательский журнал. 2024;11(149). DOI: 10.60797/IRJ.2024.149.19
12. Полевщиков АВ, Гурова ОВ, Зассеева МД, Старская ИС, Гусельникова ВВ. Динамика морфологических изменений в тимусе мыши после иммунизации. Тихоокеанский медицинский журнал. 2014;4(58):41-45.

References

1. Ponomarenko DG, Matvienko AD, Khachaturova AA, Zharinova IV, Skudareva ON, Trankvilevsky DV, et al. Analysis of the Situation on Brucellosis around the World and in the Russian Federation. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;2:36-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50 (In Russian).
2. Biotesting: guidelines for performing laboratory work. Comp.: Borisova SD. Kazan: Kazan State Power Engineering University, 2015. (In Russian).
3. Dyatlova VI, Gapelchenkova TV, Kazakov VA, Dentovskaya SV. Simulation of brucellosis in a mouse model in the biosafety level-2 laboratory. Bacteriology. 2025;10(4):47-51. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-47-51 (In Russian).
4. GOST 32296-2013. Interstate standard. Test methods for the effects of chemical products on the human body. M.: Standartinform, 2019. (In Russian).
5. OFS.1.1.1.0018. General Pharmacopoeia Article. Abnormal Toxicity (approved and put into effect by Order of the Ministry of Health of Russia dated 11.04.2025 N 188) (State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV edition) [Electronic resource]. Available at: https://internet-law.ru/documents/prod/gosudarstvennaya-farmakopeya/0/ofs_1_75262.html?ysclid=mseln33mhi 578759234 (accessed 04.08.2026). (In Russian).
6. OECD (2002), Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264070943-en
7. OECD (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: 10.1787/9789264071001-en
8. Risso GS, Carabajal MV, Bruno LA, Ibañez AE, Coria LM, Pasquevich KA, et al. U-Omp19 from *Brucella abortus* Is a Useful Adjuvant for Vaccine Formulations against *Salmonella* Infection in Mice. Front Immunol. 2017 Feb 17;8:171. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00171
9. Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. Microbes Infect. 2006 Apr;8(5):1277-86. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.006
10. Kutsenko SA. Fundamentals of Toxicology: scientific publication. St. Petersburg: OOO Izdatelstvo Foliant, 2004. (In Russian).
11. Egorov AN, Golderova AS, Troev IP. Histological evaluation of the toxicity of *Phlojodicarpus sibiricus* extract on liver and kidney of ICR line mice. International Research Journal. 2024;11(149). DOI: 10.60797/IRJ.2024.149.19. (In Russian).
12. Polevschicov AV, Gurova OV, Zasseeva MD, Starskaya IS, Guselnikova VV. Dynamic of in muscle thymus after immunization. Pacific Medical Journal. 2014;4(58):41-45. (In Russian).

Информация о соавторах:

Гапельченкова Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Казаков Виталий Анатольевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии 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:

Tatiana V. Gapelchenkova, Researcher of the Plague microbiology laboratory of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Vitaly A. Kazakov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of the laboratory for molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of Plague Microbiology laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-39-48

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 39–48
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 39–48

Воздействие литического фага Ph_15 на биопленки фагоустойчивых вариантов *Pseudomonas aeruginosa*

В.В.Кузин[1], О.А.Щербакова[1], Н.В.Колупаева[1], Е.С.Кузина[1], Л.В.Колупаева[1], Н.С.Грищенко[1], Т.И.Рудницкая[1], Р.Н.Перчиков[2], Е.В.Детушева[1]

[1]ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;
[2]ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Российская Федерация

Антибиотикорезистентность представляет собой одну из самых серьезных угроз для глобального общественного здравоохранения и срочно требует новых и эффективных решений. Бактериофаги – это бактериальные вирусы, которые все чаще признаются эффективной альтернативой традиционной антибиотикотерапии. В данном исследовании оценивалась эффективность применения бактериофагов для разрушения полисахаридного матрикса биопленок фагоустойчивых вариантов *Pseudomonas aeruginosa*. Несмотря на значительное снижение численности жизнеспособных клеток, обработка бактерий фагом приводит к появлению фагорезистентных вариантов. С целью выявления генетических детерминант резистентности проведено полногеномное секвенирование трех фагоустойчивых вариантов. На основе данных аннотирования в их геномах обнаружено 32 однонуклеотидные замены, при этом мутации затронули широкий спектр генов. Среди них идентифицированы гены систем транспорта и резистентности (*oprM*, *phnD*), факторов подвижности (*pilY*), биосинтеза аминокислот (*argD*), а также ферментов метаболизма (*acpP1*, *ntk*, *rsmC*). Выявленные несинонимичные замены могут приводить к конформационным изменениям белков и служить молекулярной основой для адаптивных фенотипических признаков штамма.

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

Для цитирования: Кузин В.В., Щербакова О.А., Колупаева Н.В., Кузина Е.С., Колупаева Л.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Перчиков Р.Н., Детушева Е.В. Воздействие литического фага Ph_15 на биопленки фагоустойчивых вариантов *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2026; 11(3): 39–48. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-39-48

Effect of lytic phage Ph_15 on the polysaccharide matrix of *Pseudomonas aeruginosa* mutants resistant to it

V.V.Kuzin[1], O.A.Shcherbakova[1], N.V.Kolupaeva[1], E.S.Kuzina[1], L.V.Kolupaeva[1], N.S.Grishchenko[1], T.I.Rudnitskaya[1], R.N.Perchikov[2], E.V.Detusheva[1]

[1]State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation;
[2]Tula State University, Tula, Russian Federation

Antibiotic resistance is one of the most serious threats to global public health and urgently requires new and effective solutions. Bacteriophages are bacterial viruses that are increasingly recognized as an effective alternative to traditional antibiotic therapy. In this study, the effectiveness of the use of bacteriophages for the destruction of the polysaccharide matrix of biofilms resistant to phage mutants of *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. Despite a significant decrease in the number of viable cells, phage treatment of bacteria led to the emergence of phage-resistant variants. In order to identify the genetic determinants of resistance, genome-wide sequencing of three phage-resistant variants was performed. Based on the annotation data, 32 single nucleotide polymorphisms were found in their genomes, with mutations affecting a wide range of genes. Among them, the genes of transport and resistance systems (*oprM*, *phnD*), motility factors (*pilY*), amino acid biosynthesis (*argD*), as well as metabolic enzymes (*acpP1*, *ntk*, *rsmC*) have been identified. The identified non-synonymous substitutions can lead to conformational changes in proteins and serve as the molecular basis for adaptive phenotypic traits of the strain.

Для корреспонденции:

Кузин Виктор Владимирович, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: kuzin@obolensk.org
ORCID: 0000-0002-1219-6704

Статья поступила 31.07.2026 принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Viktor V. Kuzin, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: 8 (4967) 31-2182
E-mail: kuzin@obolensk.org
ORCID: 0000-0002-1219-6704

Статья поступила 31.07.2026, принята к печати 30.09.2026

Key words: phage-resistant variants, Pseudomonas aeruginosa, biofilm destruction, bacteriophages, disinfectants, exopolysaccharide matrix

For citation: Kuzin V.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva N.V., Kuzina E.S., Kolupaeva L.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Perchikov R.N., Detusheva E.V. Effect of lytic phage Ph_15 on the polysaccharide matrix of *Pseudomonas aeruginosa* mutants resistant to it. Bacteriology. 2026; 11(3): 39–48. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-39-48

Pseudomonas aeruginosa – широко распространенный условно-патогенный микроорганизм, который считается одной из ведущих причин внутрибольничных инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями [1, 2]. Инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, как правило, трудно поддаются лечению, поскольку данный патоген демонстрирует высокую устойчивость к широкому спектру антимикробных препаратов за счет врожденных, приобретенных и адаптивных механизмов резистентности [3, 4]. Кроме того, эта бактерия обладает способностью прикрепляться к поверхностям и образовывать биопленки, что делает ее особенно устойчивой, поскольку, биопленка образует защитную оболочку вокруг микробного сообщества и обеспечивает микроорганизмам защитную среду [5, 6]. Для эффективной борьбы с инфекциями, вызванными *P. aeruginosa*, необходимы постоянные исследования, включающие поиск альтернативных противомикробных подходов и понимание взаимодействия между организмом и патогеном [7].

Антибактериальная активность бактериофагов против *P. aeruginosa* изучается различными группами исследователей [8, 9]. Результаты исследований [9–15] показали, что фаготерапия является эффективной стратегией борьбы с инфекциями, вызываемыми *P. aeruginosa*. Несмотря на это, фаги и их бактериальные хозяева постоянно взаимодействуют в процессе коэволюции, и бактерии выработали множество стратегий выживания. Эти стратегии включают предотвращение адсорбции фагов на бактериальных хозяевах, предотвращение проникновения ДНК фагов с помощью систем исключения суперинфекции, расщепление нуклеиновых кислот фагов с помощью систем рестрикции-модификации или систем CRISPR-Cas, а также гибель инфицированной клетки с помощью абортивных систем [16]. Следовательно, появление устойчивых к фагам вариантов бактерий после заражения фагами практически неизбежно [17]. Исследование взаимодействия фагов с биопленками показало возобновление роста популяции биопленок после заражения фагами, что было связано с развитием устойчивых к фагам вариантов [18]. При этом не приводится описания эффективности воздействия фагов и их ферментов на структуру полисахаридного матрикса фагоустойчивых вариантов *P. aeruginosa*.

Цель работы: экспериментальное сравнение эффективности использования литического фага Ph_15 для разрушения биопленок *P. aeruginosa*, сформированных референсным штаммом и фагоустойчивыми вариантом.

Материалы и методы

Штаммы бактерий, бактериофаги и условия культивирования

Референсный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск). Бактерии выращивали при 37°С в жидкой питательной среде ГРМ-бульон, а также на плотной питательной среде ГРМ №1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). В данной работе использовался ранее охарактеризованный фаг Ph_15 [19].

Дезинфицирующие вещества

В работе использовали четыре химических дезинфицирующих вещества различных функциональных классов: бензалкония хлорид 50% (Neoxim, Россия), перекись водорода 37% (ООО «ИННОВАЦИЯ», Россия), гипохлорит натрия 4% (ООО «Скоропусковский Синтез», Россия), ортофталевый альдегид 99,5% (VIRUNAL, Россия).

Инфицирование планктонных культур фагом

Культуру *P. aeruginosa*, выращенную в течение 16 ч в жидкой среде, разбавляли в соотношении 1:100 до конечного объема 25 мл и инкубировали в течение 24 ч при 37°С и 120 об./мин. По истечении этого времени клетки центрифугировали (6000 g, 4°С, 5 мин) и ресуспендировали в свежей среде LB с фагами при различной множественности инфицирования (MOI 10; 1; 0,1). Контрольные эксперименты проводили с использованием SM-буфера (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 8 мМ $MgSO_4$ и 0,01% (масс./об.) желатина) вместо фага. Смесь инкубировали при 37°С в условиях аэрации при 120 об./мин и проводили посев на плотную питательную среду через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 и 48 ч с целью отбора устойчивых вариантов *P. aeruginosa*.

Моделирование биопленки

Стерильные покровные стекла диаметром 12 мм (ООО «МиниМед», Брянск, Россия) помещали на дно стерильной чашки Петри в один слой и заливали жидкой питательной средой, содержащей микробную взвесь с концентрацией суспензии $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 $см^3$ микроорганизмов, до полного покрытия. Для приготовления суспензии тест-микроорганизма культуру смывали с агара стерильным физиологическим раствором. Полученную взвесь разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации ~$1 \cdot 10^9$ кл./$см^3$, соответствующей по мутности 3,3–3,5 ед. по стандарту Мак-Фарланда. Далее приготовленную микробную взвесь разводили стерильным ГРМ-бульоном до концентрации ~$1 \cdot 10^6$ кл./$см^3$.

Покровные стекла инкубировали в термостате при температуре +37 ± 1°С в течение 48 ч. Затем тест-поверхности со сформированной биопленкой извлекали из чашки Петри и трижды промывали стерильной дистиллированной водой с целью удаления планктонных клеток.

Воздействие фагов на биопленки P. aeruginosa

Покровные стекла с биопленкой *P. aeruginosa* погружали в фаговую суспензию (титр – не менее $1 \cdot 10^9$ БОЕ/мл) на 60 мин. Затем отмывали трехкратно в SM-буфере, переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37°С в течение 48 ч. Критерием эффектив-

ности разрушения биопленки считали полную инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде и при последующем пересеве на плотную среду. В качестве контроля вместо суспензии бактериофага использовали стерильную воду.

Комплексное применения бактериофага и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок P. aeruginosa

Покровные стекла с биопленкой *P. aeruginosa* обрабатывали суспензией бактериофага в течение 60 мин, после чего переносили в растворы дезинфицирующих веществ на 30 мин. Далее стекла погружали в раствор нейтрализатора, затем отмывали трехкратно в SM-буфере, переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Критерием эффективности разрушения биопленки считали полную инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде и при последующем пересеве на плотную среду. В качестве контроля вместо дезинфицирующего вещества использовали стерильную воду.

Фиксация образцов биопленок

Для подготовки полученных образцов к исследованию с помощью сканирующей электронной микроскопии проводили фиксацию образцов с биопленками на поверхности покровных стекол – после обработки бактериофагом, дезсредствами, а также контрольных биопленок, без воздействия.

Образцы биопленок, сформированных на поверхности покровного стекла, помещали в лунки культурального планшета на 24 лунки. Фиксацию образца осуществляли путем внесения в лунку планшета 500 мкл 25%-го раствора глутарового альдегида. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в течение 15 мин. Затем образцы трижды промывали стерильной деионизованной водой и высушивали на воздухе до полного удаления влаги.

Сканирующая электронная микроскопия биопленок

Перед съемкой образец помещали на поверхность алюминиевого столика диаметром 32 мм и фиксировали при помощи проводящего углеродного скотча. С помощью устройства магнетронного распыления Cressingtor 208HR (Cressington Scientific Instruments, Великобритания) на поверхность образца напыляли 10 нм сплава золото/палладий (60/40). Изображения получали с использованием детектора вторичных электронов, при ускоряющем напряжении 3–5 кВ [20]. Для подбора наилучшего способа визуализации биопленки сьемку образцов производили как с напылением проводящего слоя углерода, так и без покрытия. Микроструктуру образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии с полевой эмиссией (FE-SEM) на электронном микроскопе Hitachi Regulus8230 (Hitachi, Япония). Съемку изображений вели в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 3–5 кВ. Морфология образцов исследовалась с учетом поправки на поверхностные эффекты напыления проводящего слоя [20, 21].

Выделение бактериальной геномной ДНК

Экстракцию ДНК выполняли фенол-хлороформным методом. Клеточный лизис проводили в присутствии 10%-го SDS и протеиназы K. К лизату добавляли смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1), гомогенизировали на вортексе (Biosan, Латвия) и центрифугировали 10 мин (12 000 g, 4°C). Для осаждения ДНК к водной фазе добавляли изопропанол (80% от объема) и насыщенный раствор NaCl (1/9 объема). После инкубации (20 мин, 20°C) и центрифугирования (10 мин, 12 000 g) осадок промывали 400 мкл 70%-го этанола и центрифугировали в том же режиме. Высушенный осадок растворяли в 20 мкл TE-буфера (pH 8,0). Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific, США). Образцы использовали для полимеразной цепной реакции и хранили при -20°C.

Полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ бактериальных геномов

Полногеномное секвенирование проводили на платформе GenoLab M с использованием наборов SG GM PLUS (ООО «Сесана», Россия) и GenoLab M Sequencing set V2.0 (FCM 300 циклов) (GeneMind Biosciences Co., Ltd., Китай) для подготовки геномных библиотек. Сборку геномов de novo из полученных ридов выполняли в программе Unicycler (v. 0.5.0) со стандартными параметрами [22]. Идентификацию однонуклеотидных замен (SNP) осуществляли с использованием инструмента Snippy [23]. Биоинформатический анализ выполняли с использованием веб-сервера NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [24] и программного обеспечения Unipro UGENE [25].

Статистический анализ

Статистический анализ результатов экспериментов проводился с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений в программе GraphPad Prism 8. Все тесты выполнялись с уровнем достоверности $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение фагоустойчивых вариантов P. aeruginosa

В работе был использован бактериофаг Ph_15, ранее выделенный из проб воды Московской области, образующий на бактериальном газоне прозрачные негативные колонии с наличием зон неполного лизиса. Согласно Международной классификации и таксономии вирусов бактериофаг относится к литическим бактериофагам семейства *Fredfastierviridae*, рода *Jamesmcgillvirus* [19].

Инфицирование планктонной культуры *P. aeruginosa* проводилось в течение 48 ч. В ходе исследования было выдвинуто предположение, что на более поздних этапах популяция в основном состоит из фагоустойчивых вариантов *P. aeruginosa*. При этом в экспериментах наблюдалось значительное снижение количества жизнеспособных клеток *P. aeruginosa* в процессе совместного инкубирования фага и бактериальных клеток, что обусловлено литическим действием фага, при этом максимальное снижение количества планктонных клеток (на четыре порядка) было достигнуто через 6 ч после обработки фагом (рис. 1).

Далее вплоть до 48 ч после заражения наблюдалось постепенное увеличение количества планктонных клеток, что, предположительно, связано с накоплением фагоустойчивых вариантов. Для определения минимального времени, необходимого для появления устойчивых вариантов после

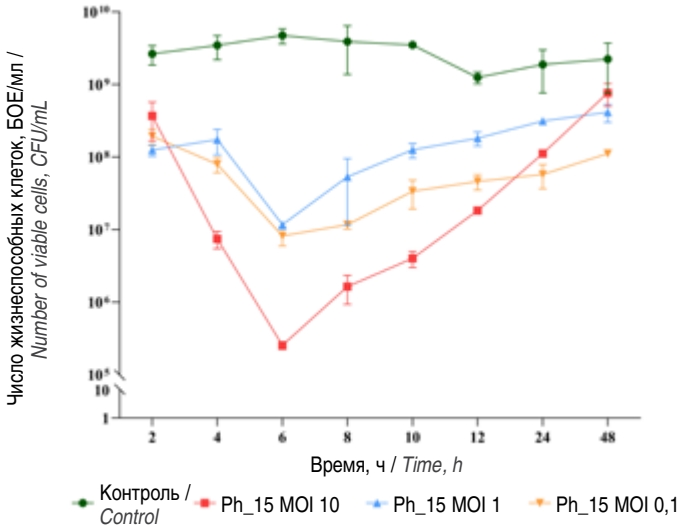


Рис. 1. **Изменение количества жизнеспособных клеток *P. aeruginosa* при инфицировании фагом Ph_15 при различной множественности инфицирования (MOI 0,1; 1; 10). Погрешности представлены стандартными отклонениями по результатам трех независимых экспериментов при $p < 0,05$.**

Fig. 1. ***Change in the number of viable P. aeruginosa cells upon infection with phage Ph_15 at various MOI. The error bars represent the standard deviations based on the results of three independent experiments at p < 0,05.***

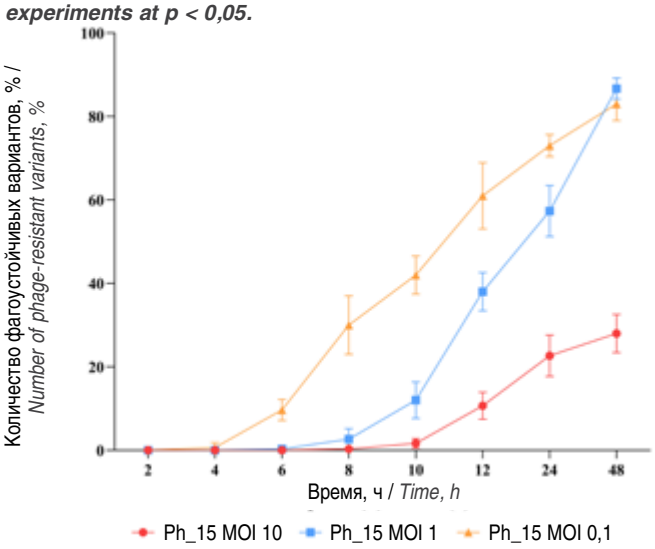


Рис. 2. **Процент колоний *P. aeruginosa*, выделенных в каждой временной точке эксперимента, устойчивых к фагу Ph_15 (MOI 0,1; 1; 10). Погрешности представлены стандартными отклонениями по результатам трех независимых экспериментов при $p < 0,05$.**

Fig. 2. ***The percentage of P. aeruginosa colonies isolated at each time point of the experiment that are resistant to phage Ph_15 (MOI 0.1, 1, 10). The error bars represent the standard deviations based on the results of three independent experiments at p < 0.05.***

заражения фагом, из проб выделяли по 10 колоний и оценивали их устойчивость к фагам. Динамика фагоустойчивых вариантов, выделенных в каждой временной точке эксперимента, показана на рис. 2.

Согласно полученным результатам, первые фагоустойчивые варианты *P. aeruginosa* были выделены уже через 6 ч после инфицирования, что согласуется с ранее проведенными исследованиями [17]. Для дальнейшего изучения были отобраны 10 устойчивых вариантов *P. aeruginosa*, выделенных после 48 ч инкубирования культуры с фагом. Также отмечалось, что колонии трех фагоустойчивых вариантов не вырабатывали желто-зеленого пигмента, что указывает на изменения, связанные с выработкой пиоцианина и флуоресцина. Сохожие результаты были опубликованы в исследовании португальских ученых [17]. Все выбранные культры сохраняли устойчивость к фагу после трехкратного пересева.

Секвенирование геномной ДНК фагоустойчивых вариантов P. aeruginosa

Геномы трех фагоустойчивых вариантов штаммов *P. aeruginosa*, утративших способность к выработке окрашивающих пигментов, были секвенированы и сравнены с геномом референсного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, не подверженного воздействию фага Ph_15, с целью выявления генетических вариаций, специфичных для фенотипа фагоустойчивости.

Анализ аминокислотных последровательностей выявлил полную идентичность геномов всех трех фагоустойчивых вариантов, что свидетельствует о принадлежности данных вариантов к единому клону. При анотировании генома фагоустойчивого варианта и его сравнения с геномом референсного штамма было обнаружено 32 однонуклеотидные замены (single nucleotide polymorphism/SNP), локализованные в 13 различных контигах (табл. 1).

Из общего числа выявленных полиморфизмов 15 (46,9%) замен являлись синонимичными и не приводили к изменению первичной структуры кодируемых белков. Остальные 17 (53,1%) SNP были классифицированы как несинонимичные мутации, обусловливающие аминокислотные замены в транслируемых продуктах. Особый интерес представляет локализация несинонимичных SNP в генах, отвечающих за адаптацию, транспорт и мембранную проницаемость бактериальной клетки.

При аннотировании были обнаружены единичные олигонуклеотидные замены идентифицированые в структурных генах белков внешней мембраны *oprM* и *oprD*, поскольку изменения в их структуре напрямую определяют профиль барьерной проницаемости и механизмы лекарственной устойчивости грамотрицательных бактерий. В частности, в контиге 7 была идентифицирована несинонимичная замена в гене oprM. Продукт данного гена является критически важным наружным компонентом эффлюксных систем семейства RND (Resistance-Nodulation-Division), таких как MexAB-OprM, обеспечивающих активное выведение антибиотиков и ксенобиотиков из клетки [26]. Подобная перестройка в структуре белка способна вызвать локальные конформационные изменения туннельного канала, что может влиять на кинетику эффлюксного насоса. В гене другого ключевого порина – *oprD* – замена имела синонимичный характер. Белок OprD выполняет функцию субстрат-специфического канала, обеспечивающего не только импорт основных аминокислот, но и антибиотиков карбапенемового ряда (имипенема и меропенема) [27]. Однако отсутствие несинонимичных замен в локусе *oprD* у исследуемого штамма указывает на сохранение нативной первичной структуры порина, что свидетельствует о потенциальной функциональности данного транспортного пути. Известно, что белок OprD и липополисахариды (ЛПС) формируют единую динамичсескую систему проницаемости наружной мембраны. Мутации в гене *oprD* могут приводить к изменению физических свойств ЛПС-матрикса наружной мембраны [28].

Таблица 1. **Характеристика и геномная локализация однонуклеотидных замен (SNP) в геноме фагоустойчивого варианта *P. aeruginosa***
Table 1. ***Characteristics and genomic localization of singlenucleotide polymorphisms (SNPs) in the genomes of three phageresistant variants of P. aeruginosa***

№ контига / *№ contigue*	Позиция SNP / *SNP's position*	Ген / Gene	Продукт гена / *Gene product*	Вариации аминокислотных замен / *Variations of amino acid substitutions*
1	39613	–	Гипотетический белок / *Hypothetical protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
2	195645	*rutF*	Белок семейства флавинредуктаз / *Protein of the flavin reductase family*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
2	437309	*Fiu*	Tonb-зависимый рецептор / *Tonb-dependent receptor*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
3	121703	*vWFA*	Белок, содержащий домен VWA / *Protein containing the VWA domain*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (R > K)*
3	241663	*acpP1*	ACP S-малонилтрансфераза / *ACP S-malonyltransferase*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (G > A)*
3	284314	–	Гипотетический белок / *Hypothetical protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P > A)*
3	284328	–	*Гипотетический белок / Hypothetical protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
3	284339	–	Гипотетический белок / *Hypothetical protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P > L)*
3	284346	–	Гипотетический белок / *Hypothetical protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
3	284350	–	Гипотетический белок / *Hypothetical protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P >S)*
4	51	–	Гипотетический белок / *Hypothetical protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
7	143494	*oprM*	Белок внешней мембраны семейства oprm / *Oprm family outer membrane protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (A > D)*
7	254225	*argD*	Белок семейства аспартатамиокиназы / *Aspartate aminotransferase kinase family protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (R > G)*
7	254243	*argD*	Белок семейства аспартатамиокиназы / *Aspartate aminotransferase kinase family protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (W > C)*
7	254252	*argD*	Белок семейства аспартатамиокиназы / *Aspartate aminotransferase kinase family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
8	21593	–	Гипотетический белок / *hypothetical protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (W > G)*
10	53504	*phnD*	Пермеаза ABC-транспортера / *ABC transporter permease*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P > A)*
13	112745	*Ntk*	Домен нуклеотидилтрансферазы NT_kntase_like / *NT_kntase_like nucleotide transferase domain*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P > R)*
13	185618	*dapA*	Белок семейства дигидродипиколинатсинтазы / *Dihydropicolinate synthase family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
13	185634	*dapA*	Белок семейства дигидродипиколинатсинтазы / *Dihydropicolinate synthase family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
13	185659	*dapA*	Белок семейства дигидродипиколинатсинтазы / *Dihydropicolinate synthase family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
13	185664	*dapA*	Белок семейства дигидродипиколинатсинтазы / *Dihydropicolinate synthase family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
13	185665	*dapA*	Белок семейства дигидродипиколинатсинтазы / *Dihydropicolinate synthase family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
14	58878	*mdcB*	Трифосфорибозил-дефосфо-коа-синтаза / *Triphosphoribosyldeoxycoa synthase*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
14	72106	*PNTB*	B-субъединица AD(P)(+) трансгидрогеназы / B-*subunit of AD(P)(+) transhydrogenase*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (S > F)*
15	143206	*oprD*	Белок внешней мембраны семейства oprd / *Oprd family protein*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
17	36187	–	Гипотетический белок / *hypothetical protein*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (G > A)*
17	48054	*mopB*	Молибдоптеринзависимая оксидоредуктаза / *Molybdopterindependent oxidoreductase*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
19	11552	*rsmC*	SAM-зависимая метилтрансфераза I класса / *SAMdependent class i methyltransferase*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P > R)*
19	85285	*pilY*	Белок сборки пилей IV типа / *Assembly protein pilus type IV*	Несинонимичная мутация / *Non-synonymous mutation (P > L)*
35	44419	*dipA*	Белок, содержащий домен дигуанилатциклазы / *Protein containing diguanylate cyclase domain*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*
35	44439	*dipA*	Белок, содержащий домен дигуанилатциклазы / *Protein containing diguanylate cyclase domain*	Синонимичная мутация / *Synonymous mutation*

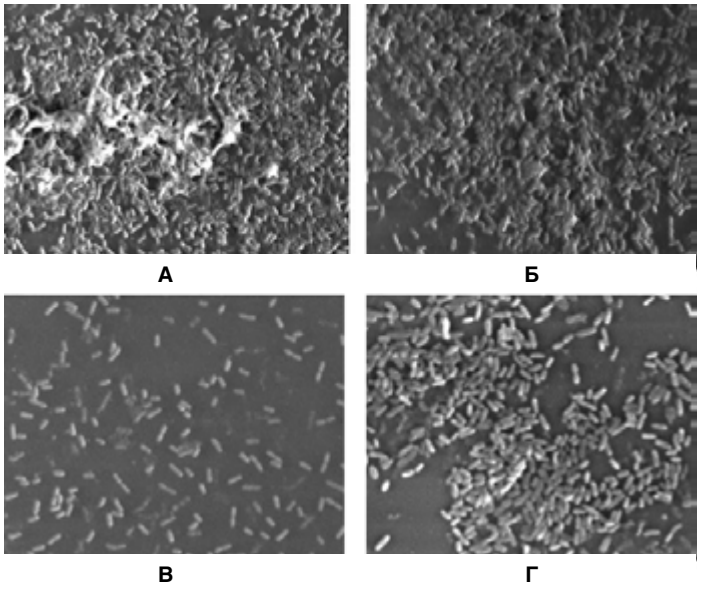


Рис. 3. **СЭМ-визуализация биопленок *P. aeruginosa*: А – сформированная биопленка *P. aeruginosa* ATCC 27853; В – сформированная биопленка фагоустойчивого варианта *P. aeruginosa*; С – биопленка *P. aeruginosa* ATCC 27853 после воздействия фага Ph_15; D – биопленка фагоустойчивого *P. aeruginosa* после воздействия фага Ph_15. Микроскоп Hitachi Regulus8230 (Hitachi, Япония) при увеличении объектива ×2000.**
*Fig. 3. **SEM visualization of P. aeruginosa biofilms: A – the formed biofilm of P. aeruginosa ATCC 27853; B – the formed biofilm of the phageresistant variant of P. aeruginosa; C – the biofilm of P. aeruginosa ATCC 27853 after exposure to phage Ph_15; D – the biofilm of phageresistant P. aeruginosa after exposure to phage Ph_15. The Hitachi Regulus8230 microscope (Hitachi, Japan) with a 2000× objective lens.***

Одно из объяснений развития устойчивости бактерий к фагам связано с рецепторами фагов. Бактерии могут избегать хищничества фагов, предотвращая их адсорбцию. Это может происходить из-за изменений в структуре рецепторов на поверхности бактериальной клетки или в их трехмерной конформации [29]. Известно что ЛПС внешней мембраны служат основными рецепторами для фагов phiIBB-PAA2 и vB_PaeM_CEB_DP1 [17].

В геномах фагоустойчивых вариантов были картированы точечные мутации в генах, обеспечивающих вирулентность и подвижности клетки. Так, например, ген *pilY* кодирует белок, который служит главным адгезином пилей IV типа [30]. Данный белок способен распознавать и связываться с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток макроорганизма или абиотических поверхностях. Таким образом, замена жесткого аминокислотного остатка пролина на лейцин в первичной структуре *pilY* может повлечь за собой конформационные изменения домена, ответственного за механотрансдукцию или связывание с рецепторами. Также описанный белок сборки пилей IV типа может являться рецептром для литических фагов *P. aeruginosa*. В работе Ceyssens показано, что мутация в генах, ответственных за синтез пилей, приводит к приобретению устойчивости бактерий к бактериофагу LUZ19 [31]. Согласно указанным данным, можно предположить, что бактериофаг Ph_15 использует пили типа IV в качестве первичных рецепторов.

Воздействие бактериофага Ph_15 на биопленки референсного штамма и фагоустойчивого варианта P. aeruginosa

При исследовании активности фага Ph_15 в отношении биопленок для их моделирования использовали референсный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 и фагоустойчивый вариант, утративший способность к выработке окрашивающих пигментов. Критерием эффективности разрушения биопленки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде. Воздействие бактериофага на структуру биопленки оценивали визуально при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

При СЭМ-анализе структуры биопленки референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 и фагоустойчивого варианта выявлена характерная трехмерная структура их организации. На микрофотографиях биопленок, полученных на поверхности покровного стекла, наблюдали трехмерную пространственную структуру организации биопленки с четко выделяющимися клетками, каналами, а также внеклеточный матрикс, окружающий клетки (рис. 3, A, B).

При воздействии бактериофага Ph_15 в течении 60 мин наблюдали разрушение экзополисахаридного матрикса для обоих вариантов биопленки, при этом в случае *P. aeruginosa* ATCC 27853 фаг обеспечивал значительное снижение числа живых клеток в биопленке (рис. 3, C) по сравнению с биопленкой фагоустойчивого варианта (рис. 3, D). Отсутствие полного лизиса бактериальных клеток в структуре биоплен-

Таблица 2. **Минимальные бактерицидные концентрации дезинфицирующих веществ в отношении планктонных культур и биопленок, сформированных *P. aeruginosa* ATCC 27853 и фагоустойчивым вариантом, обработанной фагом Ph_15**
*Table 2. **Minimum bactericidal concentrations of disinfectants against planktonic cultures and biofilms formed by P. aeruginosa ATCC 27853 and a phageresistant variant treated with phage Ph_15***

Дезинфицирующее вещество / *Disinfectant*	МБК дезинфицирующего вещества, % / *MBC of the disinfectant, %*					
	Планктонная культура / *Plankton culture*		Биопленка / Biofilm			
			Без фага / *no phage*		Обработка фагом Ph_15 / *with phage Ph_15*	
	P. a ATCC 27853	Фагоустойчивые варианты *P. a* / *Phage-resistant variants P. a*	*P. a* ATCC 27853	Фагоустойчивые варианты *P. a* / *Phage-resistant variants P. a*	*P. a* ATCC 27853	Фагоустойчивые варианты *P. a* / *Phage-resistant variants P. a*
Бензалкония хлорид / *Benzalkonium chloride*	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Перекись водорода / *peroxide*	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,5
Гипохлорит натрия / *Sodium hypochlorite*	0,075 ± 0,02	0,075 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,075 ± 0,02	0,075 ± 0,02
Ортофталевый альдегид / *Orthophthalic aldehyde*	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,05	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,05	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,05

ки обоих штаммов указывает на ограниченную эффективность монотерапии бактериофагом. Данный факт обосновывает необходимость разработки комплексных схем, сочетающих применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ, для достижения синергетического эффекта при деструкции биопленок *P. aeruginosa*.

Для сравнения эффективности использования комплексного метода разрушения биопленок, сформированных референсным штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853 и фагоустойчивым вариантом, покровные стекла с биопленкой после обработки бактериофагом Ph_15 переносили в растворы дезинфицирующих веществ (бензалкония хлорид, перекись водорода, гипохлорит натрия, ортофталевый альдегид) на 30 мин. После дезинфекционной выдержки проводили нейтрализацию действующего вещества. Критерием эффективности применения комплексной обработки для разрушения биопленки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде и при последующем пересеве на плотную среду.

Показано, что все исследуемые режимы комплексного применения бактериофага Ph_15 с дезинфицирующими веществами были одинаково эффективны для биопленок, сформированных как референсным штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853, так и фагоустойчивым вариантом (табл. 2).

Минимальная бактерицидная концентрация бензалкония хлорида в отношении биопленок обоих штаммов составила 0,3%, перекиси водорода – 2,0%, гипохлорита натрия – 0,075%, ортофталевого альдегида – 0,1%.

На основании полученных результатов была подтверждена возможность использования бактериофага Ph_15 для разрушения экзополисахаридного матрикса биопленок фагоустойчивых вариантов *P. aeruginosa*.

Заключение

Проведенные исследования подтверждают высокий потенциал бактериофагов как альтернативного терапевтического агента, способного эффективно разрушать полисахаридный матрикс биопленок и снижать численность жизнеспособных клеток *P. aeruginosa*. Вместе с тем продемонстрировано, что селективное давление фагов индуцирует быстрое формирование резистентных вариантов. При помощи полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа данных установлено, что молекулярной основой фагорезистентности может являться накопление несинонимичных нуклеотидных замен. При этом обнаруженные полиморфизмы, предположительно, обусловливают конформационные изменения кодируемых белков, обеспечивая комплексную фенотипическую адаптацию *P. aeruginosa* к фаговой инфекции. В часности, можно предположить, что фагоустойчивые варианты претерпевают изменения в составе ЛПС и пилей типа IV вследствие мутаций в генах, кодирующих данные структуры.

Экспериментальное моделирование позволило оценить эффективность бактериофага Ph_15 и его комбинаций с дезинфицирующими веществами при воздействии на биопленки, сформированные чувствительным и резистентным штаммами *P. aeruginosa*. В работе показано, что монотерапия бактериофагом Ph_15 обеспечивает деструкцию экзополисахаридного матрикса биопленок референсного и фагорезистентного вариантов, но не приводит к полной инактивации клеток. Установлено, что комплексное использование бактериофага Ph_15 с дезинфицирующими веществами обеспечивает полную элиминацию зрелых биопленок обоих изучаемых штаммов. Полученные данные открывают перспективы применения данного бактериофага в комплексных схемах дезинфекции для борьбы с биопленками фагорезистентных штаммов *P. aeruginosa*.

Источники финансирования

Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding

The study was conducted as part of the Rospotrebnadzor industry research program.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host,

technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2022 Jun 25;7(1):199. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1
2. Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. Cells. 2023 Jan 3;12(1):199. DOI: 10.3390/cells12010199
3. Sawant S, Shaikh S, Baldwin TC, Karakoula A, Rahman A. *Pseudomonas aeruginosa*: associated pathogenesis, epidemiology, resistance mechanisms, host response and emerging treatment strategies. Arch Microbiol. 2026 Apr 24;208(7):351. DOI: 10.1007/s00203-026-04839-0
4. Horcajada JP, Montero MM, Luque S, Oliver A, Paterson DL. Current management strategies of difficult-to-treat resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Infect Dis Clin North Am. 2026 Mar;40(1):41-60. DOI: 10.1016/j.idc.2025.11.001
5. Ramesh R, Rekha ND, Gopal S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: treatment strategies to combat infection. Arch Microbiol. 2025 May 10;207(6):141. DOI: 10.1007/s00203-025-04346-8
6. David A, Tahrioui A, Tareau AS, Forge A, Gonzalez M, Bouffartigues E, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifecycle: involvement of mechanical constraints and timeline of matrix production. antibiotics (Basel). 2024 Jul 24;13(8):688. DOI: 10.3390/antibiotics13080688
7. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. Front Microbiol. 2024 Apr 5;15:1374466. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1374466
8. Eiselt VA, Bereswill S, Heimesaat MM. Phage therapy in lung infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* – A literature review. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2024 Jan 23;14(1):1-12. DOI: 10.1556/1886.2023.00060
9. Shen X, Liu A, Liang X, Zhang X. Phage: Future Treatment Direction for inflammatory bowel disease Patients. Microb Dis. 2024;1. DOI: 10.54844/md.2023.0434
10. Weiner I, Kahan-Hanum M, Buchstab N, Zelcbuch L, Navok S, Sherman I, et al. Phage therapy with nebulized cocktail BX004-A for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: a randomized first-in-human trial. Nat Commun. 2025 Jul 1;16(1):5579. DOI: 10.1038/s41467-025-60598-4
11. Weissfuss C, Li J, Behrendt U, Hoffmann K, Bürkle M, Tan C, et al. Adjunctive phage therapy improves antibiotic treatment of ventilator-associated-pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. Nat Commun. 2025 May 15;16(1):4500. DOI: 10.1038/s41467-025-59806-y
12. Chan BK, Stanley GL, Kortright KE, Vill AC, Modak M, Ott IM, et al. Personalized inhaled bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Nat Med. 2025 May;31(5):1494-1501. DOI: 10.1038/s41591-025-03678-8
13. Rodriguez-Gonzalez RA, Balacheff Q, Debarbieux L, Marchi J, Weitz JS. Metapopulation model of phage therapy of an acute Pseudomonas aeruginosa lung infection. mSystems. 2024 Oct 22;9(10):e0017124. DOI: 10.1128/msystems.00171-24
14. Cunha GAD, Amaral RP, Dos Santos ALC, Aio BRF, Durante MFR, Malaquias LCC, et al. Phage therapy as an alternative strategy against *Pseudomonas aeruginosa*: a narrative review of preclinical and clinical evidence. Microbiologyopen. 2026 Jun;15(3):e70303. DOI: 10.1002/mbo3.70303
15. Makky S, Abdelrahman F, Rezk N, Easwaran M, El-Shibiny A. Phages for treatment *Pseudomonas aeruginosa* infection. Prog Mol Biol Transl Sci. 2023;201:1-19. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2023.03.014
16. Karamlou S, Aghajani J, Familsamavati M, Fallah Azad N, Arayesh S, Mohsenipour Z. Bacterial resistance to phage therapy: Mechanisms and strategies to overcome it. Current Molecular Pharmacology. 2025;18(1):108-122. DOI: 10.1016/j.cmp.2025.11.003
17. Pires DP, Dötsch A, Anderson EM, Hao Y, Khursigara CM, Lam JS, et al. A Genotypic analysis of five *P. aeruginosa* strains after biofilm infection by phages targeting different cell surface receptors. Front Microbiol. 2017 Jun 30;8:1229. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01229
18. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;54(1):397-404. DOI: 10.1128/AAC.00669-09
19. Колупаева НВ, Кузин ВВ, Щербакова ОА, Колупаева ЛВ, Калмантаева ОВ, Сухаричева НА, и др. Характеристика литического фага Ph_15, активного в отношении биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2025;10(3):42-50. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-42-50
20. Kachala VV, Khemchyan LL, Kashin AS, Orlov NV, Grachev AA, Zalesskiy SS, et al. Target-oriented analysis of gaseous, liquid, and solid chemical systems with mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and electron microscopy. Russian Chem. Reviews. 2013;82(7):648-685. DOI: 10.1070/RC2013v082n07ABEH004413
21. Кашин АС, Анаников ВП. Формирования наноразмерных покрытий и наночастиц металлов путем магнетронного распыления и их исследование методом сканирующей электронной микроскопии. Известия Академии наук. Серия химическая. 2011;12:2551-2556.
22. Unicycler: [software repository]. Developer R.R.Wick. Available at: https://github.com/rrwick/Unicycler (accessed 23.07.2026).
23. Snippy: [electronic resource]. OMICtools. Available at: https://omictools.com/snippy-tool/ (accessed 23.07.2026).
24. Mount DW. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). CSH Protoc. 2007 Jul 1;2007:pdb.top17. DOI: 10.1101/pdb.top17
25. Unipro UGENE: integrated bioinformatics tools: [electronic resource]. Available at: https://ugene.net/ (accessed 23.07.2026).
26. Racine E, Pantel L, Maurent K, Fuchs HLS, Sarciaux M, Houard J, et al. MexXY-OprM efflux pump mediates resistance to odilorhabdins in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Spectr. 2026 Jul 7;14(7):e0046626. DOI: 10.1128/spectrum.00466-26
27. Wu W, Huang J, Xu Z. Antibiotic influx and efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation and therapeutic implications. Microb Biotechnol. 2024 May;17(5):e14487. DOI: 10.1111/1751-7915.14487
28. Чеботарь ИВ, Бочарова ЮА, Маянский НА. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017;19(4):308-319.
29. Даудова АД, Демина ЮЗ, Абдрахманова РО, Баева ГР, Рубальская ТС, Ясенявская АЛ, и др. Механизмы антифаговой защиты прокариотов. Антибиотики и химиотерапия. 2024;69(6):63-71. DOI: 10.37489/0235-2990-2024-69-5-6-63-71
30. Yount TA, Shukla N, Chang YW, St Geme JW 3rd. PilY proteins: bimodular drivers of type IV pilus versatility. Trends Microbiol. 2026 Apr;34(4):431-441. DOI: 10.1016/j.tim.2025.10.016
31. Ceyssens P-J. Characterization of the infection mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage LUZ19: diss. doc. in bioscience engineering. K.U.Leuven. Leuven, 2009. Available at: kuleuven.be (accessed 27.07.2026).

References

1. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2022 Jun 25;7(1):199. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1
2. Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. Cells. 2023 Jan 3;12(1):199. DOI: 10.3390/cells12010199
3. Sawant S, Shaikh S, Baldwin TC, Karakoula A, Rahman A. *Pseudomonas aeruginosa*: associated pathogenesis, epidemiology, resistance mechanisms, host response and emerging treatment strategies. Arch Microbiol. 2026 Apr 24;208(7):351. DOI: 10.1007/s00203-026-04839-0

4. Horcajada JP, Montero MM, Luque S, Oliver A, Paterson DL. Current management strategies of difficult-to-treat resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Infect Dis Clin North Am. 2026 Mar;40(1):41-60. DOI: 10.1016/j.idc.2025.11.001
5. Ramesh R, Rekha ND, Gopal S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: treatment strategies to combat infection. Arch Microbiol. 2025 May 10;207(6):141. DOI: 10.1007/s00203-025-04346-8
6. David A, Tahrioui A, Tareau AS, Forge A, Gonzalez M, Bouffartigues E, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifecycle: involvement of mechanical constraints and timeline of matrix production. antibiotics (Basel). 2024 Jul 24;13(8):688. DOI: 10.3390/antibiotics13080688
7. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. Front Microbiol. 2024 Apr 5;15:1374466. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1374466
8. Eiselt VA, Bereswill S, Heimesaat MM. Phage therapy in lung infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* – A literature review. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2024 Jan 23;14(1):1-12. DOI: 10.1556/1886.2023.00060
9. Shen X, Liu A, Liang X, Zhang X. Phage: Future Treatment Direction for inflammatory bowel disease Patients. Microb Dis. 2024;1. DOI: 10.54844/md.2023.0434
10. Weiner I, Kahan-Hanum M, Buchstab N, Zelcbuch L, Navok S, Sherman I, et al. Phage therapy with nebulized cocktail BX004-A for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: a randomized first-in-human trial. Nat Commun. 2025 Jul 1;16(1):5579. DOI: 10.1038/s41467-025-60598-4
11. Weissfuss C, Li J, Behrendt U, Hoffmann K, Bürkle M, Tan C, et al. Adjunctive phage therapy improves antibiotic treatment of ventilator-associated-pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. Nat Commun. 2025 May 15;16(1):4500. DOI: 10.1038/s41467-025-59806-y
12. Chan BK, Stanley GL, Kortright KE, Vill AC, Modak M, Ott IM, et al. Personalized inhaled bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Nat Med. 2025 May;31(5):1494-1501. DOI: 10.1038/s41591-025-03678-8
13. Rodriguez-Gonzalez RA, Balacheff Q, Debarbieux L, Marchi J, Weitz JS. Metapopulation model of phage therapy of an acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. mSystems. 2024 Oct 22;9(10):e0017124. DOI: 10.1128/msystems.00171-24
14. Cunha GAD, Amaral RP, Dos Santos ALC, Aio BRF, Durante MFR, Malaquias LCC, et al. Phage therapy as an alternative strategy against *Pseudomonas aeruginosa*: a narrative review of preclinical and clinical evidence. Microbiologyopen. 2026 Jun;15(3):e70303. DOI: 10.1002/mbo3.70303
15. Makky S, Abdelrahman F, Rezk N, Easwaran M, El-Shibiny A. Phages for treatment *Pseudomonas aeruginosa* infection. Prog Mol Biol Transl Sci. 2023;201:1-19. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2023.03.014
16. Karamlou S, Aghajani J, Familsamavati M, Fallah Azad N, Arayesh S, Mohsenipour Z. Bacterial resistance to phage therapy: Mechanisms and strategies to overcome it. Current Molecular Pharmacology. 2025;18(1):108-122. DOI: 10.1016/j.cmp.2025.11.003
17. Pires DP, Dötsch A, Anderson EM, Hao Y, Khursigara CM, Lam JS, et al. A Genotypic analysis of five *P. aeruginosa* strains after biofilm infection by phages targeting different cell surface receptors. Front Microbiol. 2017 Jun 30;8:1229. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01229
18. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;54(1):397-404. DOI: 10.1128/AAC.00669-09
19. Kolupaeva NV, Kuzin VV, Shcherbakova OA, Kolupaeva LV, Kalmantaeva OV, Sukharicheva NA, et al. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Bacteriology. 2025;10(3):42-50. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-42-50 (In Russian).
20. Kachala VV, Khemchyan LL, Kashin AS, Orlov NV, Grachev AA, Zalesskiy SS, et al. Target-oriented analysis of gaseous, liquid, and solid chemical systems with mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and electron microscopy. Russian Chem. Reviews. 2013;82(7):648-685. DOI: 10.1070/RC2013v082n07ABEH004413
21. Kashin AS, Ananikov VP. Formation of nanoscale coatings and metal nanoparticles by magnetron sputtering and their study using scanning electron microscopy. Proceedings of the Academy of Sciences. Chemical Series. 2011;60(12):2551-2556. (In Russian).
22. Unicycler: [software repository]. Developer R.R.Wick. Available at: https://github.com/rrwick/Unicycler (accessed 23.07.2026).
23. Snippy: [electronic resource]. OMICtools. Available at: https://omictools.com/snippy-tool/ (accessed 23.07.2026).
24. Mount DW. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). CSH Protoc. 2007 Jul 1;2007:pdb.top17. DOI: 10.1101/pdb.top17
25. Unipro UGENE: integrated bioinformatics tools: [electronic resource]. Available at: https://ugene.net/ (accessed 23.07.2026).
26. Racine E, Pantel L, Maurent K, Fuchs HLS, Sarciaux M, Houard J, et al. MexXY-OprM efflux pump mediates resistance to odilorhabdins in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Spectr. 2026 Jul 7;14(7):e0046626. DOI: 10.1128/spectrum.00466-26
27. Wu W, Huang J, Xu Z. Antibiotic influx and efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation and therapeutic implications. Microb Biotechnol. 2024 May;17(5):e14487. DOI: 10.1111/1751-7915.14487
28. Chebotar IV, Bocharova YuA, Mayansky NA. Mechanisms and regulation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2017;19(4):308-319. (In Russian).
29. Daudova AD, Demina YuZ, Abdrakhmanova RO, Baeva GR, Rubalskaia TS, Yasenyavskaya AL, et al. Mechanisms of antiphage defense in prokaryotes. Antibiotics and Chemotherapy. 2024;69(6):63-71. DOI: 10.37489/0235-2990-2024-69-5-6-63-71 (In Russian).
30. Yount TA, Shukla N, Chang YW, St Geme JW 3rd. PilY proteins: bimodular drivers of type IV pilus versatility. Trends Microbiol. 2026 Apr;34(4):431-441. DOI: 10.1016/j.tim.2025.10.016
31. Ceyssens P-J. Characterization of the infection mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage LUZ19: diss. doc. in bioscience engineering. K.U.Leuven. Leuven, 2009. Available at: kuleuven.be (accessed 27.07.2026).

Информация о соавторах:

Щербакова Ольга Анатольевна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колупаева Надежда Вячеславовна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кузина Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колупаева Любовь Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Грищенко Наталья Семёновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Перчиков Роман Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории биологически активных соединений и биокомпозитов Тульского государственного университета

Детушева Елена Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga A. Shcherbakova, Junior Researcher of the Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Nadezhda V. Kolupaeva, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Ekaterina S. Kuzina, PhD in Biological Sciences, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Lyubov V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

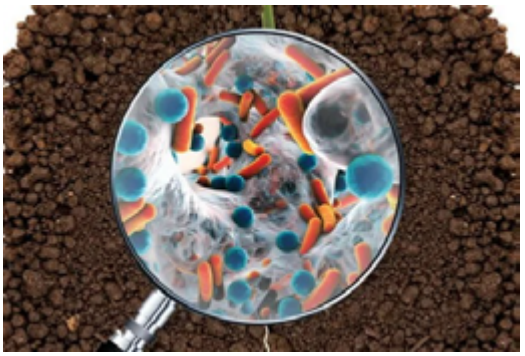
Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Roman N. Perchikov, Junior Researcher at the laboratory of biologically active compounds and biocomposites, Tula State University

Elena V. Detusheva, PhD in Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Preparations in the Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Улучшение понимания экологических микробиомов посредством тематического моделирования: количественный и качественный анализ



Понимание динамики экосистем имеет решающее значение для оценки их состояния, однако это остается сложной задачей из-за запутанных биотических и абиотических взаимодействий. Микробные сообщества являются ценными индикаторами изменений окружающей среды, но высокая размерность данных микробиома требует применения продвинутых аналитических методов. В данном исследовании изучается использование тематического моделирования (ТМ) – метода обучения без учителя из области машинного обучения, изначально разработанного для анализа текстов, – для анализа данных микробиома динамичного эстуария Варно в южной части побережья Балтийского моря.

Мы применили тематическое моделирование к данным микробного состава эстуарного биома и сравнили его эффективность с традиционными методами снижения размерности: методом главных компонент (PCA) и методом главных координат (PCoA). Количественные результаты показывают, что ТМ сопоставим с традиционными подходами по сохранению экологической и функциональной информации, а в некоторых аспектах даже превосходит их. Кроме того, мы качественно демонстрируем, что метод неотрицательной матричной факторизации (NNMF), являющийся разновидностью тематического моделирования, улавливает скрытые закономерности в данных, обеспечивая интерпретируемую перспективу микробиома. В рамках данного исследовательского подхода NNMF выявил пять различных субсообществ внутри эстуария, которые, по всей видимости, следуют сезонной смене, обусловленной притоком пресной воды. Эти субсообщества были связаны с определенными диапазонами солености и температуры и имели отчетливые таксономические профили с общими характеристиками во всей эстуарной системе.

Эти результаты позволяют предположить, что тематическое моделирование является полезным инструментом для изучения сложных наборов данных микробиома окружающей среды, предлагая дополнительную перспективу, которая может дать новые экологические сведения. Способность ТМ выделять согласованные паттерны микробных сообществ указывает на его потенциал в поддержке мониторинга окружающей среды и информировании целевого управления экосистемами в динамичных средах, хотя для полной оценки применимости метода требуются дальнейшие исследования.

Kujat AS, Hassenrück C, Lüdtke S, Labrenz M, Sperlea T. Enhancing the understanding of environmental microbiomes through topic modeling: a quantitative and qualitative analysis. Environ Microbiome. 2026 Jul 15;21(1):90. DOI: 10.1186/s40793-026-00927-2

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-49-57

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 49–57
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 49–57

Скрининг и оптимизация парных комбинаций моноклональных антител для иммунодетекции ботулинического нейротоксина серотипа B

Т.А.Иващенко, А.С.Карцева, А.К.Рябко, Н.А.Зенинская, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, Я.О.Романенко, И.С.Лутчева, А.А.Ершова, В.В.Фирстова

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

Ботулизм представляет собой потенциально опасное инфекционное заболевание, этиологическим фактором которого выступают штаммы бактерий рода Clostridium, синтезирующие ботулинический нейротоксин (BoNT). Своевременное обнаружение BoNT имеет большое значение для подтверждения клинического диагноза и определения серотипа BoNT, вызывающего заболевание.

Цель работы заключается в определении диагностической ценности панели моноклональных антител (МКА) и последующем подборе их наиболее эффективных парных комбинаций для высокочувствительной детекции ботулинического нейротоксина серотипа B (BoNT/B).

Материалы и методы. Рекомбинантные белки экспрессировали в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3), предварительно трансформированном плазмидными векторами pET-LCB и pET-HCB, сконструированными на базе исходной коммерческой плазмиды pET-22b(+). МКА модифицировали путем конъюгации с N-гидроксисукцинимидным эфиром биотина. Подбор комбинаций МКА проводили в формате иммуноферментного анализа («сэндвич»-ИФА). Оценку эффективности детектирования BoNT/B проводили в условиях сложных биологических матриц, представленных сывороткой крови человека и 10%-м раствором бычьего сывороточного альбумина.

Результаты. В результате проведенного скрининга было идентифицировано 38 комбинаций МКА, 4 из которых обеспечивали детекцию рекомбинантного фрагмента тяжелой цепи ботулинического нейротоксина (rBoNT/B-HC) в диапазоне концентраций от 0,2 до 0,9 нг/мл, а 3 пары МКА демонстрировали высокоспецифическое связывание с легкой цепью токсина (rBoNT/B-LC).

Определена наиболее эффективная комбинация антител, в которой в качестве захватывающего выступало МКА HCB 3-20, а в качестве детектирующего – МКА HCB 3-18. Данная пара антител обеспечивала минимальный предел обнаружения целевого антигена, составивший 0,2 нг/мл.

Проведена оценка эффективности связывания МКА с токсином в сложных биологических средах. Показано, что минимальная детектируемая концентрация ботулотоксина в сыворотке крови составила 5 нг/мл, а в растворе альбумина – 10 нг/мл.

Заключение. Подобранные комбинации МКА, специфичных к BoNT/B, могут представлять собой перспективную технологическую платформу для создания высокочувствительных систем иммуноанализа. Полученные иммунореагенты могут быть эффективно интегрированы как в классический формат «сэндвич»-ИФА, так и в гетерогенные детекционные платформы на основе магнитных микросфер, что открывает широкие возможности для вариативности и оптимизации инструментального выявления BoNT/B.

Ключевые слова: ботулизм, ботулинический нейротоксин типа B, моноклональные антитела, «сэндвич»-ИФА, детекция

Для цитирования: Иващенко Т.А., Карцева А.С., Рябко А.К., Зенинская Н.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Романенко Я.О., Лутчева И.С., Ершова А.А., Фирстова В.В. Скрининг и оптимизация парных комбинаций моноклональных антител для иммунодетекции ботулинического нейротоксина серотипа B. Бактериология. 2026; 11(3): 49–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-49-57

Screening and optimization of paired monoclonal antibody combinations for immunodetection of botulinum neurotoxin serotype B

T.A.Ivashchenko, A.S.Kartseva, A.K.Riabko, N.A.Zeninskaya, M.A.Marin, M.M.Rogozin, Ya.O.Romanenko, I.S.Lutcheva, A.A.Ershova, V.V.Firstova

Для корреспонденции:

Иващенко Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0002-4908-2524

Статья поступила 26.08.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

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

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0002-4908-2524

The article was received 26.08.2026, accepted for publication 30.09.2026

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

Botulism is a potentially dangerous infectious disease caused by Clostridium bacteria that synthesize botulinum neurotoxin (BoNT). Timely detection of BoNT is essential for confirming the clinical diagnosis and determining the causative BoNT serotype.

The purpose of this study was to determine the diagnostic value of a panel of monoclonal antibodies (mAbs) and subsequently select the most effective paired combinations for highly sensitive detection of botulinum neurotoxin serotype B (BoNT/B).

Materials and methods. Recombinant proteins were expressed in Escherichia coli BL21(DE3) pre-transformed with pET-LCB and pET-HCB plasmid vectors, constructed from the original commercial pET-22b(+) plasmid. The mAbs were modified by conjugation with biotin N-hydroxysuccinimide ester. The selection of mAb combinations was performed using a sandwich ELISA. The efficiency of BoNT/B detection was assessed in complex biological matrices consisting of human serum and 10% bovine serum albumin.

Results. Thirty-eight mAb combinations were identified as a result of the screening. Four of these mAbs detected the recombinant heavy chain fragment of botulinum neurotoxin (rBoNT/B-HC) in the concentration range of 0.2 to 0.9 ng/ml, while three mAb pairs demonstrated highly specific binding to the toxin's light chain (rBoNT/B-LC).

The most effective antibody combination was identified, in which the HCB 3-20 mAb served as the capture antibody and the HCB 3-18 mAb served as the detection antibody. This pair of antibodies provided a minimum detection limit of 0.2 ng/ml for the target antigen.

The binding efficiency of the mAbs to the toxin was assessed in complex biological environments. The minimum detectable concentration of botulinum toxin in serum was 5 ng/ml, and in albumin solution, 10 ng/ml.

Conclusion. The selected combinations of mAbs specific to BoNT/B may represent a promising technological platform for the development of highly sensitive immunoassay systems. The resulting immunoreagents can be effectively integrated into both the classic sandwich ELISA format and heterogeneous detection platforms based on magnetic microspheres, opening up broad possibilities for variability and optimization of instrumental detection of BoNT/B.

Key words: botulism, botulinum neurotoxin type B, monoclonal antibodies, sandwich ELISA, detection

For citation: Ivashchenko T.A., Kartseva A.S., Riabko A.K., Zeninskaya N.A., Marin M.A., Rogozin M.M., Romanenko Ya.O., Lutcheva I.S., Ershova A.A., Firstova V.V. Screening and optimization of paired monoclonal antibody combinations for immunodetection of botulinum neurotoxin serotype B. Bacteriology. 2026; 11(3): 49–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-49-57

Ботулинические нейротоксины (BoNTs) – белковые вещества, синтезируемые грамположительной палочковидной бактерией *Clostridium botulinum*, представленные семью серологически и генетически различающимися типами (A–G) и обладающие избирательным протеолитическим действием в отношении SNARE-белков синаптического аппарата, что обусловливает их крайне высокую нейротоксичность [1].

Серотипы A и B являются причиной подавляющего числа случаев заболевания ботулизмом и летальных исходов у человека [2]. Обладая статусом одного из наиболее летальных биологических агентов естественного происхождения, BoNTs отнесены к категории патогенов класса A. Их токсичность превосходит аналогичный показатель цианистого калия приблизительно в 10^{11} раз [3]. Летальная доза для взрослого человека при пероральном попадании варьирует от 5 до 50 нг на 1 кг массы тела. Патогенез заболевания характеризуется пролонгированным течением: процесс реконвалесценции протекает крайне медленно, а неврологические нарушения требуют длительного периода реабилитации [4].

Ботулинический нейротоксин серотипа B (BoNT/B), как один из наиболее опасных и распространенных серотипов, часто встречается в случаях пищевых отравлений. Как и другие ботулинические токсины, BoNT/B состоит из легкой (LC) и тяжелой (HC) цепей, связанные одной дисульфидной связью. HC в основном отвечает за связывание с нервными клетками и облегчение их перемещения, в то время как LC опосредует нейротоксический эффект, блокируя нейротрансмиссию [5].

Вспышки заболевания среди людей регистрируются по всему миру, при этом пищевое отравление является наиболее распространенной формой заболевания [6]. В связи с этим обнаружение BoNT в продуктах питания является крайне актуальной задачей. Биопроба на мышах является распространенным стандартным методом подтверждения ботулизма. Несмотря на высокую чувствительность, этот метод сопряжен с трудностями интерпретации получаемых данных и может давать неоднозначные результаты. Биологический анализ на мышах – медленный процесс, требующий как минимум 4 дней для завершения, использования лабораторных животных и оценки конечной точки на основе смертности. Поэтому необходимы новые более быстрые и надежные методы обнаружения [7].

Благодаря своей уникальной способности распознавать молекулы-мишени моноклональные антитела (МКА) являются важным инструментом для диагностики и терапии ботулизма. Однако их разработка существенно осложняется выраженной антигенной гетерогенностью BoNT, представленного семью серологически дифференцированными серотипами, уровень вариабельности которых по аминокислотной последовательности составляет 34–64%. Дополнительный фактор вариативности обусловлен наличием внутри серотипов множества подтипов, демонстрирующих аминокислотные различия в диапазоне 1,6–32% [8]. В связи с этим своевременность и терапевтическая эффективность лечения возможны при условии быстрой дифференциации серотипов нейротоксина.

Высокую эффективность в лабораторной практике продемонстрировали иммунологические методы, основанные на применении специфических антител. В частности, иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет выявить и идентифицировать ботулинический нейротоксин всего за 5–6 ч. Разработанные в ряде лабораторий ИФА-тесты по своей чувствительности уже практически не уступают классическому мышиному биоанализу [9].

Цель настоящей работы заключается в определении диагностической ценности панели МКА и последующем подборе их наиболее эффективных парных комбинаций для высокочувствительной детекции ботулинического нейротоксина серотипа В (BoNT/B).

Материалы и методы

Получение рекомбинантных легкой и тяжелой цепей ботулинического нейротоксина типа В (rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC)

Рекомбинантные белки были наработаны с плазмид pET-HCB и pET-LCB, сконструированных на основе исходного немодифицированного коммерческого вектора pET-22b(+) (Invitrogen, США) по методу, описанному в [10].

Полученные плазмиды использовали для экспрессии рекомбинантных белков в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3). Клетки-продуценты выращивали в среде 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, при 37°С до достижения оптимальной оптической плотности культуры. Накопление целевых белков осуществляли в течение 18 ч при 25°С. Очистку рекомбинантных белков проводили на приборе AKTA FPLC (GE Healthcare, ex-Amersham) в два этапа: металл-хелатная хроматография с последующей доочисткой при помощи гель-фильтрационной хроматографией на колонке Superdex 75 (GE Healthcare, Великобритания) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (pH 7,4). Чистоту полученных белков контролировали электрофорезом в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ)..

Подбор комбинаций моноклональных антител («сэндвич» – дот-блот)

МКА, специфичные к LC и HC BoNT/B, получали с использованием стандартной методики, описанной нами в предыдущих исследованиях [11]. В качестве иммуногена использовали рекомбинантные белки rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC.

Каждое МКА тестировалось в комбинации со всеми используемыми в исследовании МКА для выявления пар, способных обнаруживать рекомбинантные rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC. Для этого МКА были конъюгированы с биотином с использованием биотинсукцинимидного эфира (Sigma, США) по методу Duk [12] с 50-кратным молярным избытком биотинового реагента. В качестве захватывающего антитела использовалось немеченое МКА, а в качестве детектирующего – биотинилированная форма. На нитроцеллюлозную мембрану (GE Water & Process Technologies, США) с помощью прибора Bio-Dot (Bio-Rad, США) наносили немеченые биотином антитела в концентрации 10 мкг/мл МКА в ФСБ. Далее мембрану блокировали 0,05%-м обезжиренным молоком в течение 1 ч при 37°С и добавляли раствор рекомбинантных rBoNT/B-LC или rBoNT/B-HC в концентрации 10 мкг/мл, затем биотинилированное МКА добавляли в разведении 1:400 в растворе ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После каждой инкубации мембрану отмывали 4 раза с использованием раствора ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т). Далее вносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена («Имтек», Россия) в рабочем разведении 1:10 000.

Визуализацию реакции проводили раствором субстрата – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma, США) – в течение 20 мин при 37°С, после чего измеряли значения абсорбции на фотометре Multiskan (Labsistems, США) при длине волны 450 нм. Реакцию останавливали после отчетливо различимого окрашивания образцов путем погружения мембраны в дистиллированную воду.

Определение минимальной детектируемой концентрации rBoNT/B-LC и rBoNT/A-HC50 методом «сэндвич»-ИФА

Полистироловые 96-луночные планшеты для ИФА покрывали немечеными биотином МКА в ФСБ, pH 7,4 с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при температуре 37°С, затем 4 раза промывали ФСБ-Т. Свободные сайты пластика блокировали добавлением в каждую лунку по 160 мкл молока 0,05%-й жирности, инкубировали в течение 1 ч на шейкере при температуре 37°С и промывали 3 раза ФСБ-Т. Далее добавляли растворы рекомбинантных белков rBoNT/B-LC и rBoNT/A-HC50 в исходной концентрации 500 нг/мл, последовательно разбавляя в 2 раза. Для определения ботулотоксина в сложных матричных системах проводили последовательное разведение рекомбинантных белков rBoNT/BLC и rBoNT/AHC50 в 10%-й человеческой сыворотке и растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma-Aldrich, США).

В качестве контроля использовали лунки без добавления антигена. Затем биотинилированное МКА добавляли в разведении 1:400 в растворе ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После каждой инкубации планшет отмывали 4 раза с использованием раствора ФСБ-Т. Затем в лунки планшета добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена («Имтек», Россия) в разведении 1:10 000 в ФСБ-Т. После этого в лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора на основе тетраметилбензидина (TMB). Реакцию оценивали по появлению синего окрашивания раствора. Интенсивность окрашивания измеряли на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark) при λ = 450 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение рекомбинантных легкой и тяжелой цепей ботулинического нейротоксина типа В (rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC)

На первом этапе были получены рекомбинантные белки LC BoNT/B и HC BoNT/B. Белки очищали методом металл-хелатной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. При электрофоретическом разделении образцы мигрировали в виде пятен молекулярной массой 52,1 и 57,8 кДа, что соответствует теоретически расчетным значениям для белков LC BoNT/B и HC BoNT/B (рис. 1). Белки LC BoNT/B и HC BoNT/B были получены с высокой степенью чистоты (~ 97%) и выходом более 45 и 25 мг/л культуры соответственно.

Скрининг и валидация диагностических пар моноклональных антител

На следующем этапе работы методом гибридомной технологии была получена панель МКА, специфичных к LC (9 клонов) и к HC (21 клон) BoNT/B. Разработка панели МКА проводилась с целью выбора пар антител, пригодных для создания высокочувствительной иммунохимической тест-системы для детекции BoNT/B. Стратегия скрининга антител основывалась на матричном подходе, при котором каждый клон МКА последовательно тестировали в комбинации со всеми остальными клонами из сгенерированной библиотеки МКА.

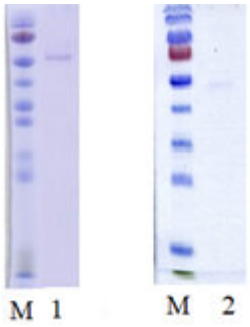


Рис. 1. **Результаты электрофоретического разделения рекомбинантных очищенных белков. М – маркер молекулярных масс SM0671 (Invitrogen); 1 – белок HC50 BoNT/B, MW 57,8 кДа; 2 – белок LC BoNT/B после финальной очистки, MW 52,1 кДа.**
*Fig. 1. **Results of electrophoretic separation of recombinant purified proteins. M – Molecular mass marker SM0671 (Invitrogen); 1 – HC50 BoNT/B protein, MW 57.8 kDa; 2 – LC BoNT/B protein after final purification, MW 52.1 kDa.***

Для создания детектирующего компонента МКА подвергали конъюгации с N-гидроксисукцинимидным эфиром биотина, что обеспечивало образование стабильной амидной связи с ε-аминогруппами лизиновых остатков в молекуле иммуноглобулина. Неконъюгированное МКА иммобилизовали на планшете в качестве захватывающего реагента, тогда как его биотинилированный аналог применяли в качестве детектирующего антитела с последующей визуализацией комплекса при помощи конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена.

В ходе перекрестного сэндвич-анализа всех возможных сочетаний МКА были идентифицированы 38 функциональных комбинаций, проявляющих специфическое связывание с целевыми антигенами. В частности, установлено, что 4 пары МКА обеспечивали эффективное детектирование rBoNT/B-LC, тогда как оставшиеся 34 комбинации детектировали rBoNT/B-HC50. Результаты скрининга парных сочетаний МКА и оценка их аналитической чувствительности представлены в таблице.

Определение чувствительности полученных пар МКА

После выбора комбинаций захватывающего и детектирующего МКА была проведена серия экспериментов в формате «сэндвич»-ИФА, целью которых являлась сравнительная оценка аналитической эффективности всех возможных сочетаний пар антител по критерию максимальной чувствительности. Валидация каждой комбинации проводилась путем титрования rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC50 BoNT/B в диапазоне концентраций, обеспечивающем определение предела обнаружения. Итоговый выбор диагностической пары осуществлялся на основе минимальной детектируемой концентрации целевого антигена. Данное исследование позволило идентифицировать комбинацию МКА, обладающую наибольшей чувствительностью и специфичностью.

В ходе скрининга методом «сэндвич»-ИФА было идентифицировано 19 комбинаций МКА, проявляющих специфическое связывание с rBoNT/B-HC50 BoNT/B. Наибольшую аналитическую чувствительность продемонстрировали 4 пары МКА, три из которых были образованы МКА НСВ 3-29, НСВ 3-23 и НСВ 3-20 в качестве захватывающих в комбинации с детектирующим МКА НСВ 3-18. Четвертая комби-

Таблица 1. **Результаты скрининга парных сочетаний моноклональных антител (МКА) и оценка их аналитической чувствительности**
*Table 1. **Results of screening paired monoclonal antibody (MAb) combinations and assessment of their analytical sensitivity***

МКА иммобилизованное / *MAb immobilized*	МКА детектирующее / *MAb detecting*	Предел обнаружения в ИФА, нг/мл / *Detection limit in ELISA, ng/ml*
МКА к rBoNT/B-HC		
НСВ 3-23	НСВ 3-29	–
НСВ 3-20	НСВ 3-29	10
НСВ 3-8-3	НСВ 3-29	–
НСВ 3-18	НСВ 3-29	–
НСВ 3-29	НСВ 3-23	7
НСВ 3-20	НСВ 3-23	0,9
НСВ 3-8	НСВ 3-23	–
НСВ 3-18	НСВ 3-23	1,9
НСВ 3-29	НСВ 3-5	250
НСВ 3-23	НСВ 3-5	7,8
НСВ 3-20	НСВ 3-5	62
НСВ 3-8-3	НСВ 3-5	–
НСВ 3-18	НСВ 3-5	7,8
НСВ 3-29	НСВ 3-12	–
НСВ 3-23	НСВ 3-12	–
НСВ 3-20	НСВ 3-12	–
НСВ 3-8	НСВ 3-12	125
НСВ 3-18	НСВ 3-12	30
НСВ 3-29	НСВ 3-18	7
НСВ 3-20	НСВ 3-18	7
НСВ 3-8	НСВ 3-18	–
НСВ 3-18	НСВ 3-18	7
НСВ 3-29	НСВ 3-20	30
НСВ 3-23	НСВ 3-20	1,9
НСВ 3-8	НСВ 3-20	–
НСВ 3-18	НСВ 3-20	30
НСВ 3-29	НСВ 3-8	–
НСВ 3-23	НСВ 3-8	–
НСВ 3-18	НСВ 3-8	–
НСВ 3-29	НСВ 3-18	0,4
НСВ 3-23	НСВ 3-18	0,9
НСВ 3-20	НСВ 3-18	0,2
МКА к rBoNT/B-LC		
LCB 4-78	LCB 4-23	1,9
LCB 4-67	LCB 4-23	125
LCB 4-67	LCB 4-79	–
LCB 4-23	LCB 4-79	62

Серым цветом выделены пары МКА, демонстрирующие минимальный предел обнаружения целевого антигена; красным цветом – обладающие перекрестной специфической активностью в отношении BoNT/A и BoNT/B; «–» указывает на отсутствие специфического связывания. /
Pairs of MAbs demonstrating the minimum detection limit of the target antigen are highlighted in gray; MAbs exhibiting cross-specific activity against BoNT/A and BoNT/B are highlighted in red. «–» indicates the absence of specific binding.

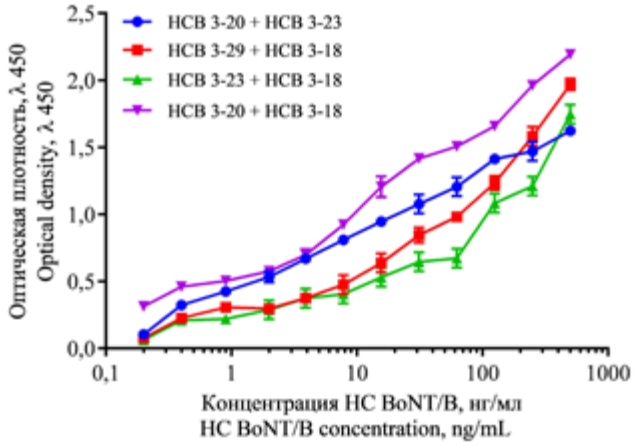


Рис. 2. **Результаты детекции rBoNT/B-HC с использованием пар МКА в «сэндвич»-формате ИФА. Представлены кривые титрования, полученные при использовании трех захватывающих антител (НСВ 3-29, НСВ 3-23, НСВ 3-20) в комбинации с двумя детектирующими биотинилированными антителами (НСВ 3-23 и НСВ 3-18).**

*Fig. 2. **Results of rBoNT/B-HC detection using MAbs pairs in a sandwich ELISA format. Titration curves obtained using three capture antibodies (HCB 3-29, HCB 3-23, HCB 3-20) in combination with two biotinylated detection antibodies (HCB 3-23 and HCB 3-18) are shown.***

нация была образована захватывающими МКА НСВ 3-20 и мечеными МКА НСВ 3-23. Предел обнаружения rBoNT/B-HC50 в указанных конфигурациях варьировал от 0,9 до 0,2 нг/мл, что свидетельствует о высокой чувствительности полученных МКА. Наиболее эффективной оказалась комбинация антител, в которой в качестве захватывающего выступало МКА НСВ 3-2, а в качестве детектирующего – МКА НСВ 3-18. Данная пара антител обеспечивала самый низкий уровень обнаружения целевого антигена (0,2 нг/мл). Данные по сравнению эффективности рабочих пар МКА представлены на рис. 2. Результаты отражают специфичность взаимодействия антител с антигеном и позволяют оценить чувствительность каждой комбинации.

При анализе распознавания легкой цепи rBoNT/B-LC установлено, что из 4 протестированных комбинаций МКА специфическую реактивность в формате «сэндвич»-ИФА проявили 3 пары антител. Оптимальной комбинацией антител оказалась пара, в которой МКА LCB 4-78 выполняло функцию захватывающего антитела, а МКА LCB 4-23 – детектирующего. Данная комбинация обеспечила наиболее низкий порог обнаружения среди всех вариантов, специфичных к LC-домену. Результаты определения аналитической чувствительности комбинаций МКА представлены в таблице.

Оценку воспроизводимости данного анализа в сложных матрицах оценивали на модельных системах, содержащих rBoNT/B-LC и rBoNT/A-HC50, последовательно разведенные в растворе человеческой сыворотки и BSA для имитации *in vivo* условий и контроля неспецифической сорбции. Для данного этапа исследования были отобраны только те пары антител, которые продемонстрировали максимальную эффективность в предварительных экспериментах с буферным раствором, что позволило сфокусировать исследование на наиболее перспективных кандидатах (рис. 3).

Данный эксперимент показал снижение иммунохимического сигнала при использовании исследуемых матриц. В частности, отмечено, что пара МКА НСВ 3-20 и НСВ 3-18, ранее продемонстрировавшая высокую эффективность при детекции НС BoNT/B в буферном растворе (0,2 нг/мл), характеризовалась снижение эффективности в матричном растворе примерно до 5 нг/мл (в сыворотке крови) и до 10 нг/мл (в растворе альбумина).

Обсуждение

BoNTs признаны высокотоксичными веществами, представляющими наибольшую угрозу в контексте биотерроризма [13]. В экстренных клинических ситуациях успех лечения напрямую

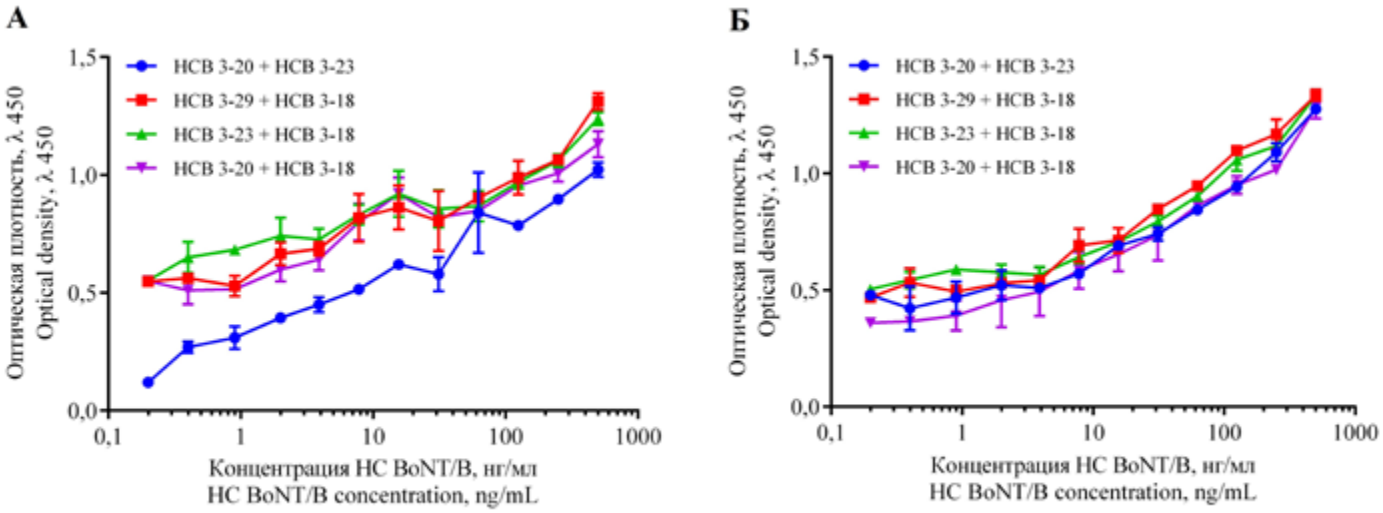


Рис. 3. **Влияние компонентов сложных биологических матриц на эффективность детекции rBoNT/B-HC в «сэндвич»-варианте твердофазного ИФА с использованием пар МКА: а – кривые, полученные при добавлении rBoNT/B-HC в сыворотку крови человека; б – полученные при добавлении rBoNT/B-HC в 10%-й раствор бычьего сывороточного альбумина. Представлены кривые титрования, полученные при использовании трех захватывающих антител (НСВ 3-29, НСВ 3-23, НСВ 3-20) в комбинации с двумя детектирующими биотинилированными антителами (НСВ 3-23 и НСВ 3-18).**

*Fig. 3. **Effect of complex biological matrix components on rBoNT/B-HC detection efficiency in a sandwich solid-phase ELISA using pairs of MAbs: a – curves obtained by adding rBoNT/B-HC to human serum; b – curves obtained by adding rBoNT/B-HC to a 10% bovine serum albumin solution. Titration curves obtained using three capture antibodies (HCB 3-29, HCB 3-23, and HCB 3-20) in combination with two biotinylated detection antibodies (HCB 3-23 and HCB 3-18) are shown.***

зависит от скорости распознавания симптомов и оперативного лабораторного детектирования BoNTs в биоматериале пациента. В связи с этим возникает острая необходимость в быстрых и высокочувствительных диагностических методах, позволяющих обнаруживать BoNTs и определять серотип.

В настоящем исследовании представлена панель МКА и оптимизированы их парные сочетания, обладающие высоким потенциалом для конструирования экспресс-систем иммунодетекции BoNT/B. Максимальная аналитическая чувствительность в формате гетерогенного «сэндвич»-ИФА была достигнута при использовании антител HCB 3-29, HCB 3-23 или HCB 3-20 в качестве иммобилизованной (захватывающей) фазы в комбинации с детектирующим антителом HCB 3-18. Разра-ботанные пары МКА обеспечивали эффективную регистрацию рекомбинантного фрагмента тяжелой цепи (rBoNT/B-HC50) в линейном диапазоне от 0,2 до 0,9 нг/мл, а также выявление легкой цепи (rBoNT/B-LC) с минимально определяемой концентрацией 1,9 нг/мл. Ключевым преимуществом и отличительной особенностью разработанной системы является ее аналитическая универсальность на этапе первичного связывания антигена. Проведенный ранее анализ перекрестной реактивности показал, что полученные захватывающие МКА обладают выраженным сродством не только к целевому токсину серотипа B, но и к рекомбинантным доменам ботулинического нейротоксина серотипа A.

Данный феномен находит строгое структурно-биологическое обоснование: согласно результатам рентгеноструктурного анализа, транслокационные домены BoNT/A и BoNT/B характеризуются высокой степенью гомологии и фактически идентичной пространственной укладкой, что детерминирует наличие общих консервативных эпитопов для генерации перекрестно-реагирующих МКА [14]. Поскольку заранее определить серотип токсина, ставшего причиной инфекции, в клинических условиях часто невозможно, рационально применять в качестве захватывающих антител МКА с широкой перекрестной активностью. Такая стратегия позволяет эффективно концентрировать и изолировать из образца токсины обоих эпидемически значимых серотипов (A и B) на одной подложке. Окончательная верификация и дифференциация конкретного серотипа реализуются на следующем этапе за счет применения высокоспецифичного детектирующего антитела. В частности, применение МКА HCB 3-29 в качестве иммобилизованного, обеспечивающего одновременное распознавание ботулинических токсинов серотипов A и B, в комплексе с детектирующим МКА HCB 3-18, характеризующимся выраженной сероспецифичностью к BoNT/B, позволило создать аналитическую систему с пределом обнаружения на уровне 0,4 нг/мл.

Полученные нами параметры чувствительности согласуются с мировыми данными. Так, в работе Trinh et al., посвященной скринингу мышиных МКА, специфичных к легкой цепи BoNT/B, минимальный предел детекции рекомбинантной формы легкой цепи ботулотоксина с использованием МКА 3B7 составлял лишь 4 нг/мл [15], что подчеркивает конкурентоспособность разработанных нами иммунореагентов (1,9 нг/мл).

Таким образом, применение МКА, сочетающих универсальность связывания на этапе захвата с возможностью дифференцированного сэндвич-анализа, оптимизирует и значительно удешевляет производство мультиплексных диагностических и терапевтических платформ благодаря сокращению номенклатуры необходимых антител.

Разработка высокочувствительных систем детекции ботулинического нейротоксина серотипа B (BoNT/B) имеет первостепенное значение для пищевой безопасности и клинической диагностики. Главной аналитической проблемой в этой области остается необходимость надежного обнаружения токсина в сложных биологических матрицах – пищевых продуктах и биоматериалах. В исследовании Scotcher et al., например, описаны МКА, специфичные для BoNT/B, демонстрирующие эффективное взаимодействие с иммобилизованным токсином в стандартных тестах (прямой ИФА и вестерн-блоттинг). Однако критическим ограничением данных конструкций является полная утрата связывающей способности в гомогенной фазе (в растворе), что делает невозможным их использование для детекции в физиологических условиях [16].

В нашей работе было изучено влияние многокомпонентных сред на эффективность иммунодетекции BoNT/B с помощью подобранных комбинаций МКА. Наблюдаемое снижение аналитического сигнала в сложных модельных системах указывает на выраженные матричные эффекты. Они обусловлены присутствием эндогенных белков, липидов и гетерофильных антител, которые экранируют антиген или конкурируют за сайты связывания.

Продемонстрированные нами пределы обнаружения BoNT/B, составившие 5 нг/мл в сыворотке крови и 10 нг/мл в растворе альбумина, сопоставимы с литературными данными, где порог детекции токсина в такой сложной матрице, как, например, рыбная продукция, был определен на уровне 10 нг/мл. Данное соответствие подтверждает высокую аналитическую чувствительность и состоятельность разработанной нами методики.

Разработанная Stanker et al. тест-система обладает субнанограммовой чувствительностью в пищевых матрицах (2 нг/г в говяжьем фарше) [17]. Тем не менее полученные нами пределы обнаружения BoNT/B (5 нг/мл в сыворотке крови) также свидетельствуют о высоком сродстве подобранных МКА к токсину. С учетом того, что сыворотка крови представляет собой более агрессивную для иммуноанализа среду с точки зрения неспецифического связывания, достигнутая чувствительность подтверждает высокий потенциал нашей панели для практического применения в клинических сценариях.

В Российской Федерации также активно развиваются инструменты для мониторинга токсинов в сложных средах. В 2013 г. во ФГУП «ГНЦПП» зарегистрировали мультианалитный иммунохроматографический тест – экспресс-тест для выявления ботулотоксинов типов A и B. Заявленная чувствительность теста для серотипа B составляет 10 нг/мл [18].

Для диагностических целей в 2014 г. был запатентован штамм гибридных клеток мыши 3F11, который продуцирует высокоспецифичные МКА к BoNT/B. Разработка принадлежит ФБУН «ГНЦ ПМБ» (Оболенск) [19].

Параллельно развивается и терапевтическое направление: хотя на данный момент в России нет зарегистрированных лекарственных препаратов на основе МКА к BoNT/B. Однако в

2024 г. Минздрав России разрешил клинические исследования препарата на основе МКА против ботулинического токсина типа А, что создает основу для будущей разработки аналогичных средств и против типа В (разработка НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи). Это закладывает технологическую базу для создания аналогичных средств против серотипа В [20].

Таким образом, разработанная нами панель МКА может быть использована в качестве реагентной базы для конструирования диагностических систем иммунодетекции BoNT/B, в т.ч. в сложной биологической матрице. Данные антитела могут эффективно применяться как в классических «сэндвич»-ИФА, так и гетерогенных форматах с использованием магнитных микросфер, что обеспечивает гибкость при выборе платформы для обнаружения ботулинического нейротоксина серотипа В.

Заключение

В ходе данной работы был проведен скрининг и подбор функциональных пар МКА, специфичных к BoNT/B. Полученные результаты демонстрируют, что комбинация МКА НСВ 3-20 и НСВ 3-18 обеспечивает стабильное распознавание целевого антигена, что является критическим условием для создания чувствительных тест-систем.

Ключевым преимуществом предложенного диагностического подхода является использование МКА как для захвата, так и для детекции аналита. Такой подход позволяет полностью отказаться от использования лабораторных животных для получения антитоксических сывороток и сводит к минимуму вариабельность, неизбежно возникающую при работе с поликлональными препаратами, гарантируя высокую воспроизводимость результатов. Это открывает широкие перспективы для внедрения предложенного метода в практику клинико-диагностических лабораторий и структуры мониторинга биобезопасности.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой научной программы Роспотребнадзора в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН «ГНЦ ПМБ».

Funding

The work was carried out within the framework of the industry scientific program of Rospotrebnadzor at the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology on a unique scientific facility of the Federal Budgetary Institution of Science State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Bever CS, Scotcher M, Cheng LW, Hnasko RM, Stanker LH. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies to Botulinum Neurotoxin Type E. Toxins (Basel). 2019;11(7):407. DOI: 10.3390/toxins11070407
2. Tighe AP, Schiavo G. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. Toxicon. 2013;67:87-93. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.11.011
3. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster Medicine and Public Health Preparedness. 2007;1(2):122-134. DOI: 10.1097/DMP.0b013e318158c5fd
4. Никифоров ВВ, Кожевникова АВ. Ботулизм: новые данные о патогенезе, ближайших исходах и отдаленных последствиях болезни. Журнал инфектологии. 2025;17(2):5-20. DOI: 10.22625/2072-6732-2025-17-2-5-20
5. Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. Nature Structural Biology. 2000;7(8):693-699. DOI: 10.1038/78005
6. Honeyman DA, Notaras A, Heslop DJ, MacIntyre CR. Botulism outbreak in Russia connected to readymade salads. Global Biosecurity. 2024;6:1-15. DOI: 10.31646/gbio.292
7. Sesardic D, Leung T, Das RG. Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. Biologicals. 2003;31(4):265-276. DOI: 10.1016/j.biologicals.2003.08.001
8. Garcia-Rodriguez C, Geren IN, Lou J, Conrad F, Forsyth C, Wen W, et al. Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS. 2011;24(3):321-331. DOI:10.1093/protein/gzq111
9. Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. Journal of Food Protection. 2004;67(1):203-206. DOI: 10.4315/0362-028X-67.1.203
10. Иващенко ТА, Романенко ЯО, Карцева АС, Силкина МВ, Марьин МА, Хлынцева АЕ, и др. Моноклональные антитела, способные ингибировать взаимодействие рецептор-связующего домена вируса SARS-CoV-2 с ангиотензин-

превращающим рецептором 2 клеток человека. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;(3):111-117. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117
11. Duk M, Lisowska E, Wu JH, Wu AM. The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand. Anal Biochem. 1994;221(2):266-72. DOI: 10.1006/abio.1994.1410
12. Патент № 2361921 C1 Российская Федерация, МПК C12N 15/31, C12N 1/21, C12P 21/02. Способ получения функционально активного рекомбинантного белка летального фактора язвы (LF), рекомбинантная плазмидная ДНК pETHIS-LF, кодирующая активный белок LF и штамм *Escherichia coli* BL-HISLF, продуцирующий активный белок летального фактора сибирской язвы: №2007143248/13: заявл. 23.11.2007: опубл. 20.07.2009. Колесников АВ, Захарова МЮ, Козырь АВ, Шемякин ИГ; заявитель Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН.
13. Eun-Sun C, So-Hyeon K, Jun-Ho J, Hwajung Yi, Yoon-Seok C. Development of a Laboratory Test for Botulism Using Sandwich ELISA. Public Health Wkly Rep. 2023;16(44):1491-1503. DOI: 10.56786/PHWR.2023.16.44.1
14. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends in Biochemical Sciences. 2002;27(11),552-558. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02177-1
15. Trinh TV, Nguyen DV, Hoang HD, Pham HV, Vu DN, Le PV, et al. Development and selection of candidate monoclonal antibodies for the detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype B light chain. Journal of Microbiological Methods. 2025;228:106659. DOI: 10.1016/j.pep.2025.106659
16. Scotcher MC, Cheng LW, Stanker LH. Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD_{50} levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. PLoS ONE. 2010;5:1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0011047
17. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, et al. A monoclonal antibody-based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. Toxins. 2013;5(11):2212-2226. DOI: 10.3390/toxins5112212
18. Шиленко ИВ, Ярков СП, Шаулина ЕК, Титов АА, Бровкина АН, Храмов ЕН. Разработка мультианалитного иммунохроматографического устройства для индикации токсинов. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:103-106.
19. Иващенко ТА, Белова ЕВ, Мицевич ИВ, Мицевич ЕВ, Козырь АВ, Колесников АВ, и др. Штамм гибридных клеток животных *Mus musculus* 3F11 – продуцент моноклональных антител, специфичных к ботулиническому токсину типа В. Патент 27.10.2015 Бюл. №30, 2014145295/10, 12.11.2014.
20. Деркаев АА, Рябова ЕИ, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Носков АН, Виноградова ИД, и др. Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2025;25(1):58-70.

References

1. Bever CS, Scotcher M, Cheng LW, Hnasko RM, Stanker LH. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies to Botulinum Neurotoxin Type E. Toxins (Basel). 2019;11(7):407. DOI: 10.3390/toxins11070407
2. Tighe AP, Schiavo G. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. Toxicon. 2013;67:87-93. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.11.011
3. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster Medicine and Public Health Preparedness. 2007;1(2):122-134. DOI: 10.1097/DMP.0b013e318158c5fd
4. Nikiforov VV, Kozhevnikova AV. Botulism: new data on pathogenesis, nearest outcomes and distant consequences of the disease. Journal Infectology. 2025;17(2):5-20. DOI: 10.22625/2072-6732-2025-17-2-5-20 (In Russian).
5. Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. Nature structural biology. 2000;7(8):693-699. DOI: 10.1038/78005
6. Honeyman DA, Notaras A, Heslop DJ, MacIntyre CR. Botulism outbreak in Russia connected to readymade salads. Global Biosecurity. 2024;6:1-15. DOI: 10.31646/gbio.292
7. Sesardic D, Leung T, Das RG. Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. Biologicals. 2003;31(4):265-276. DOI: 10.1016/j.biologicals.2003.08.001
8. Garcia-Rodriguez C, Geren IN, Lou J, Conrad F, Forsyth C, Wen W, et al. Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS. 2011;24(3):321-331. DOI:10.1093/protein/gzq111
9. Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. Journal of Food Protection. 2004;67(1):203-206. DOI: 10.4315/0362-028X-67.1.203
10. Ivashchenko TA, Romanenko YaO, Kartseva AS, Silkina MV, Mar'in MA, Khlyntseva AE, et al. Monoclonal antibodies capable of inhibiting the interaction of the receptor binding domain of SARS-CoV-2 virus with the angiotensin-converting receptor 2 of human cells. Problemy osobo opasnykh infektsii. 2024;3:111-117. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117 (In Russian).
11. Duk M, Lisowska E, Wu JH, Wu AM. The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand. Anal Biochem. 1994;221(2):266-72. DOI: 10.1006/abio.1994.1410
12. Patent No 2361921 C1 Russian Federation, IPC C12N 15/31, C12N 1/21, C12P 21/02. Method for producing a functionally active recombinant protein of ulcer lethal factor (LF), recombinant plasmid DNA pETHIS-LF encoding the active LF protein and the *Escherichia coli* strain BL-HISLF producing the active protein of anthrax lethal factor: No 2007143248/13: declared 23.11.2007: published 20.07.2009. Kolesnikov AV, Zakharova MYu, Kozyr AV, Shemyakin IG; applicant Institution of the Russian Academy of Sciences Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS.
13. Eun-Sun C, So-Hyeon K, Jun-Ho J, Hwajung Yi, Yoon-Seok C. Development of a Laboratory Test for Botulism Using Sandwich ELISA. Public Health Wkly Rep. 2023;16(44):1491-1503. DOI: 10.56786/PHWR.2023.16.44.1
14. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends in Biochemical Sciences. 2002;27(11),552-558. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02177-1
15. Trinh TV, Nguyen DV, Hoang HD, Pham HV, Vu DN, Le PV, et al. Development and selection of candidate monoclonal antibodies for the detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype B light chain. Journal of Microbiological Methods. 2025;228:106659. DOI: 10.1016/j.pep.2025.106659
16. Scotcher MC, Cheng LW, Stanker LH. Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD_{50} levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. PLoS ONE. 2010;5:1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0011047
17. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, et al. A monoclonal antibody-based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. Toxins. 2013;5(11):2212-2226. DOI: 10.3390/toxins5112212
18. Shilenko IV, Yarkov SP, Shaulina EK, Titov AA, Brovkina AN, Khramov EN. Development of multi-analytical immune-chromatographic device for toxin indication. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2015;4:103-106. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-103-106
19. Ivashchenko TA, Belova EV, Mitsevich IV, Mitsevich EV, Kozyr AV, Kolesnikov AV, et al. Animal hybrid cell strain *Mus musculus* 3F11 – a producer of monoclonal antibodies specific to botulinum toxin type B. № RU 2566553. Patent October 27, 2015.

20. Derkaev AA, Ryabova EI, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Noskov AN, Vinogradova ID, et al. A modified single-domain antibody candidate for the treatment of botulism caused by botulinum toxin type A. Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2025;25(1):58-70. DOI: 10.30895/2221-996X-2025-591

Информация о соавторах:

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

Рябко Алёна Константиновна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-7478-909X

Зенинская Наталья Алексеевна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-5388-292X

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

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

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

Лутчева Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0005-1829-7871

Ершова Анастасия Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0002-0463-7925

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

Information about co-authors:

Alena S. Kartseva, PhD in Biological Sciences, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Alena K. Riabko, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-7478-909X

Natalya A. Zeninskaya, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-5388-292X

Maxim A. Marin, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Yana O. Romanenko, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Irina S. Lutcheva, Junior Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anastasia A. Ershova, Junior Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0002-0463-7925

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief research scientist of the laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9898-9894

Ученые возродили мощный антибиотик, который был побежден супербактериями



Устойчивый к ванкомицину *Enterococcus faecium* (VREfm) является одной из основных причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, что требует поиска новых подходов к лечению. В данной работе показано, что генетическая или фармакологическая инактивация высококонсервативной пептидогликан-гидролазы семейства NlpC/P60 – секретируемого антигена A (SagA) – повышает чувствительность VREfm к ванкомицину как *ex vivo*, так и *in vivo*. Примечательно, что делеция гена *sagA* арушает процессы ремоделирования пептидогликана и рост VREfm, а также усиливает действие ванкомицина. Кроме того, нами были выявлены первые в своем классе ковалентные ингибиторы пептидогликан-гидролаз семейства NlpC/P60. Было продемонстрировано, что фармакологическое подавление активности *SagA* также нарушает ремоделирование пептидогликана и повышает эффективность ванкомицина в отношении различных клинических изолятов VREfm. Таким образом, наше исследование показывает, что пептидогликан-гидролазы являются перспективными мишенями для лекарственного воздействия, а их инактивация способствует повышению эффективности ванкомицина против VREfm.

Fam KT, Chodisetti PK, Wang Z, Homer JA, Smedley CJ, Kitamura S, et al.
Genetic and pharmacological inactivation of peptidoglycan remodeling increases antibiotic susceptibility of vancomycin-resistant Enterococcus faecium.
Nat Commun. 2026 Jun 16;17(1):7581. DOI: 10.1038/s41467-026-74057-1

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 58–67
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 58–67

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-58-67

Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Shigella flexneri* ST245 2a, вызвавшего вспышку дизентерии у пациентов дома престарелых

В.И.Соломенцев, Л.А.Шишкина, А.Ю.Лебедева, Т.Н.Мухина, К.В.Детушев, Д.В.Волков, А.А.Сизова, И.П.Мицевич, М.Г.Теймуразов, М.А.Евсеева, Н.Н.Карцев, М.В.Фурсов, И.А.Дятлов

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

Вспышки шигеллеза ежегодно регистрируются в различных странах мира. Одним из основных возбудителей заболевания являются бактерии *Shigella flexneri*, вызывающие вспышки в реабилитационных центрах, учреждениях длительного ухода и других организациях социального обслуживания. Бактерии рода *Shigella* занимают одно из ведущих мест среди возбудителей бактериальной диареи и отнесены к приоритетным патогенам, вызывающим кишечные инфекции. Использование метагеномного анализа клинических образцов и полногеномного секвенирования штаммов бактерий (WGS) – методический подход, позволяющий в кратчайшие сроки идентифицировать возбудителя, охарактеризовать его молекулярно-генетические свойства и подтвердить клональный характер вспышки острой кишечной инфекции.

В данной работе проведен метагеномный анализ трех клинических образцов, а также WGS с последующим биоинформатическим анализом 26 клинических бактериальных изолятов, идентифицированных как *S. flexneri*. Показано, что все изученные изоляты принадлежат к сиквенс-типу ST245, серотипу 2a, несут одинаковые наборы генов факторов патогенности (*ipaBCDH*, *virA* и *set1AB*) и генов антибиотикорезистентности (bla_{EC-8}, bla_{OXA-1}, $bla_{CTX-M-15}$, *catA1*, *sat2*, *dfrA1*, *tetB* и *qnrS1*). Филогенетический и SNP-анализы показали высокую степень генетического родства изолятов (SNP ≤8), что свидетельствует об их клональном происхождении.

Ключевые слова: Shigella flexneri, вспышка острой кишечной инфекции, метагеном, полногеномное секвенирование, биоинформатический анализ

Для цитирования: Соломенцев В.И., Шишкина Л.А., Лебедева А.Ю., Мухина Т.Н., Детушев К.В., Волков Д.В., Сизова А.А., Мицевич И.П., Теймуразов М.Г., Евсеева М.А., Карцев Н.Н., Фурсов М.В., Дятлов И.А. Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Shigella flexneri* ST245 2a, вызвавшего вспышку дизентерии у пациентов дома престарелых. Бактериология. 2026; 11(3): 58–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-58-67

Molecular genetic characterization of *Shigella flexneri* strain ST245 2a caused an outbreak of dysentery in nursing home patients

V.I.Solomentsev, L.A.Shishkina, A.Yu..Lebedeva, T.N.Mukhina, K.V.Detushev, D.V.Volkov, A.A.Sizova, I.P.Mitsevich, M.G.Teimurazov, M.A.Evseeva, N.N.Kartsev, M.V.Fursov, I.A.Dyatlov

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

Outbreaks of dysentery are reported annually worldwide. *Shigella flexneri* is the leading cause of shigellosis, causing outbreaks in rehabilitation centers, long-term care facilities, and elsewhere. *Shigella* spp. is the second leading cause of bacterial diarrhea worldwide and is considered a priority pathogen among enteric bacteria. Using the metagenomic analysis of clinical samples and the whole-genome sequencing (WGS) of bacterial strains is a methodological approach that allows for the rapid identification of the pathogen, characterization of its molecular genetic properties, and confirmation of the clonal nature of an acute intestinal infection outbreak. In this study, metagenomic analysis of three clinical samples was performed, along with WGS followed by bioinformatics analysis of 26 clinical bacterial isolates identified as *S. flexneri*, the causative agent of this AII outbreak. All *S. flexneri* isolates studied were shown to belong to sequence type ST245, serotype 2a, and carry identical sets of pathogenicity factor genes (*ipaBCDH*, *virA*, and *set1AB*) and antibiotic resistance genes (bla_{EC-8}, bla_{OXA-1}, $bla_{CTX-M-15}$, *catA1*, *sat2*,

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: +7(4967) 36-00-00
E-mail: fursov@obolensk.org
ORCID: 0000-0001-9137-9551

Статья поступила 01.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: +7(4967) 36-00-00
E-mail: fursov@obolensk.org
ORCID: 0000-0001-9137-9551

The article was received 01.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

dfrA1, *tetB*, and *qnrS1*). Phylogenetic and SNP analyses revealed a high degree of genetic relatedness among the isolates (SNP ≤ 8), indicating their clonal origin.
Key words: Shigella flexneri, acute intestinal infection outbreak, metagenome, whole-genome sequencing, bioinformatic analysis

For citation: Solomentsev V.I., Shishkina L.A., Lebedeva A.Yu., Mukhina T.N., Detushev K.V., Volkov D.V., Sizova A.A., Mitsevich I.P., Teimurazov M.G., Evseeva M.A., Kartsev N.N., Fursov M.V., Dyatlov I.A. Molecular genetic characterization of *Shigella flexneri* strain ST245 2a caused an outbreak of dysentery in nursing home patients. Bacteriology. 2026; 11(3): 58–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-58-67

Shigella – род грамотрицательных факультативно-анаэробных бактерий, включающий в себя 4 вида: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* и *S. dysenteriae*. *Shigella* spp. являются возбудителями шигеллеза, острой кишечной инфекции (ОКИ) с преимущественно фекально-оральным механизмом передачи. По имеющимся оценкам, ежегодно в мире регистрируется ~165 млн случаев шигеллеза, ~1 млн из которых заканчиваются летальным исходом [1]. Данная инфекция имеет высокую эпидемиологическую значимость во всем мире. Особенно уязвимыми группами населения являются дети младшего возраста и лица старших возрастных групп. Согласно глобальным оценкам, в 2016 г. среди людей старше 70 лет с инфекциями, вызванными *Shigella* spp., было связано ~74 тыс. смертей, что соответствовало 10,7% смертей от диарейных заболеваний в этой возрастной группе [2].

Ведущим возбудителем шигеллеза является *S. flexneri*. Заражение людей может происходить при непосредственном контакте с инфицированным человеком, через контаминированные руки и предметы обихода, а также при употреблении загрязненных шигеллами пищевых продуктов и воды [3]. Важной эпидемиологической особенностью *S. flexneri* является низкая инфицирующая доза: развитие заболевания возможно при попадании в организм ~10^2 бактериальных клеток [4]. Это способствует быстрому распространению инфекции в организованных коллективах, включая учреждения длительного ухода, где тесный контакт между проживающими и персоналом, а также необходимость постоянного ухода за маломобильными пациентами создают дополнительные условия для передачи возбудителя [5].

В последние годы особую угрозу представляет распространение штаммов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП). В обновленном перечне приоритетных бактериальных патогенов Всемирной организации здравоохранения 2024 г. фторхинолон-резистентные *Shigella* spp. были переведены из категории «среднего приоритета» в категорию «высокого приоритета» для разработки новых средств лечения и мер контроля антимикробной резистентности [6]. Резистентность *S. flexneri* к АМП вызывает растущую обеспокоенность, особенно в связи с международным доминированием мультирезистентных (MDR) штаммов; около половины штаммов данного патогена во многих частях мира в настоящее характеризуются MDR-фенотипом [7, 8]. Интересно, что вспышка ОКИ, вызванная MDR-штаммом *S. flexneri* серотипа 2a, протекавшая в период с 2021 по 2023 г. в штате Нью-Мексико, США, охватила не только людей, но и нечеловеческих приматов [9]. Для *S. flexneri* описаны различные механизмы устойчивости к АМП: выведение лекарств активными эффлюксными насосами; снижение клеточной проницаемости и сверхэкспрессия ферментов, модифицирующих и инактивирующих лекарственные препараты; модификация мишени путем мутации. Антимикробная резистентность у *Shigella* носит многофакторный характер, поскольку может возникать посредством врожденных, приобретенных или адаптивных механизмов, и инфекции, возникающие в результате этого, чрезвычайно трудно поддаются лечению [10].

Ключевыми факторами патогенности *S. flexneri* является факторы инвазии и внутриклеточного распространения, эффекторные белки системы секреции III типа, а также энтеротоксины ShET-1 и ShET-2. После попадания возбудителя в кишечник человека развитие инфекции определяется его способностью преодолевать эпителиальный барьер и размножаться внутри клеток хозяина. Одним из механизмов преодоления эпителиального барьера *S. flexneri* является транслокация через М-клетки, которые переносят бактерии из просвета кишечника в подлежащую лимфоидную ткань. Там шигеллы захватываются макрофагами, активируют каспазу-1 и вызывают пироптотическую гибель инфицированных клеток. Разрушение макрофагов сопровождается высвобождением провоспалительных цитокинов и способствует развитию выраженной воспалительной реакции. Освободившиеся бактерии получают доступ к базолатеральной поверхности эпителиальных клеток, со стороны которой инвазия происходит наиболее эффективно [11].

Инвазия эпителиальных клеток и последующее внутриклеточное распространение *S. flexneri* определяются совокупностью плазмидных и хромосомных факторов патогенности данного микроорганизма. Центральную роль в проникновении бактерий в эпителиальные клетки играет система секреции III типа, структурные компоненты и многие эффекторы которой локализованы на крупной плазмиде вирулентности pINV [12]. Белки *S. flexneri* IpaB и IpaC формируют транслоконовую пору в мембране клетки-хозяина, через которую в цитоплазму доставляются бактериальные эффекторы [13]. К числу секретируемых системой секреции III типа эффекторов относится VirA, способствующий инвазии эпителиальных клеток и формированию внутриклеточной ниши, в частности, посредством активации кальпаинов клетки-хозяина (белков семейства кальций-зависимых нелизосомальных цистеиновых протеаз) [14]. Ряд доставляемых эффекторов вызывает локальную перестройку актинового цитоскелета клеток-мишеней, приводящую к поглощению бактерии и образованию вакуоли, содержащей *Shigella*. После разрушения вакуолярной мембраны *S. flexneri* выходит в цитоплазму, где размножается и перемещается посредством IcsA-зависимой полимеризации актина, обеспечивающей распространение бактерий в соседние клетки [3]. Помимо факторов инвазии, в патогенезе шигеллезной инфекции может участвовать хромосомно кодируемый энтеротоксин ShET-1, субъединицы которого определяются генами *set1A* и *set1B*. В экспериментальных моделях ShET-1 вызывает в тонком кишечнике нако-

пление жидкости и нарушение ионного транспорта, что способствует развитию ранней водянистой фазы диареи при шигеллезе [15].

Наряду с набором факторов патогенности важной эпидемиологической характеристикой *S. flexneri* является принадлежность к определенному серотипу, определяемому структурными особенностями О-антигена липополисахарида. Наличие генетически детерминированных различий в структуре О-антигена позволяет проводить серотипирование *S. flexneri* по данным полногеномного секвенирования [16]. У *S. flexneri* идентифицированы 19 серотипов – 1a, 1b, 1d, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4av, 4b, 5a, 5b, 6, X, Y, Xv, Yv, 7a и 7b, частота встречаемости которых варьирует в разных географических регионах. Разнообразие этих серотипов обусловлено наличием генов, отвечающих за присоединение к сахарным остаткам цепи О-антигена гликозила (*gtr*), ацетила (*oac*) или фосфоэтаноламина (*PEtN*), а также за транспортировку повторяющихся единиц из цитоплазмы в периплазму (*wzx*) [17]. Ведущим серотипом *S. flexneri* является серотип 2a, широко распространенный в разных регионах мира. Так, в многоцентровом исследовании GEMS, включавшем 7 стран Африки к югу от Сахары и страны Южной Азии, он был наиболее распространенным серотипом *S. flexneri* и составил 29% всех изолятов этого вида и 31% изолятов, полученных от пациентов с умеренной и тяжелой диареей [18]. В Китае также самым распространенным серотипом *S. flexneri* был 2a (41%), большинство изолятов несли гены вирулентности *ipaH* (100%), *sat* (94%), *sigA* (79%), *set1B* (78%), *pic* (78%), *set1A* (75%), *virF* (65%), *sepA* (64%), *sen* (57%), *ipaBCD* (51%), *ial* (47%) и *virB* (47%) [19].

Для более детальной генетической характеристики изолятов *S. flexneri* серотипирование в современных исследованиях дополняют мультилокусным сиквенс-типированием (MLST), основанным на определении аллельных профилей 7 консервативных генов «домашнего хозяйства»: аспартатаминотрансферазы *aspC*, АТФ-зависимой протеазы *clpX*, ацил-КоА-синтетазы *fadD*, изоцитратдегидрогеназы *icdA*, транспортера лизина *lysP*, малатдегидрогеназы *mdh* и β-глюкуронидазы *uidA*. MLST-профиль *S. flexneri* подтверждает ее происхождение от *Escherichia coli* и четко разделяет штаммы на две основные эволюционные линии. Метод выявляет высокое аллельное разнообразие и позволяет эффективно отслеживать эпидемические клоны, что имеет важное значение для эпидемиологического надзора [20]. Бактерии рода *Shigella* группируются в три генетических кластера: 1) клональный комплекс CC245 (ST245), доминирующий для *S. flexneri*, включающий большинство классических серотипов (1–5, а также варианты X и Y); 2) клональный комплекс CC10 (ST100), широко распространенный глобальный сиквенс-тип, к которому относятся большинство современных мультирезистентных изолятов *S. flexneri* серотипов 2a, 1a и нового варианта Xv; 3) клональный комплекс CC243 (ST243), обособленная филогенетическая ветвь, к которой генетически относятся серотипы 6 и 6a, эволюционировавшие независимо от остальных вариантов *S. flexneri* [21].

Однако разрешающей способности классического MLST недостаточно для установления близкого генетического родства изолятов в пределах локальной вспышки. В то же время полногеномное секвенирование (WGS) позволяет проводить высокоразрешающий филогенетический анализ на основе различий между геномами, определять положение исследуемых изолятов относительно ранее охарактеризованных штаммов и выявлять генетически обособленные группы. При расследовании вспышек филогенетический анализ дополняют оценкой попарных расстояний на основе однонуклеотидных полиморфизмов, что обеспечивает количественную характеристику различий между близкородственными изолятами и позволяет выявлять «вспышечные» кластеры. Наряду с филогенетическим типированием, данные WGS позволяют выявлять гены антибиотикорезистентности и хромосомные мутации, связанные со снижением чувствительности к противомикробным препаратам [21, 22].

Несмотря на высокую разрешающую способность, ограничением метода WGS с точки зрения быстроты расследования вспышек ОКИ является необходимость предварительного выделения чистой культуры возбудителя. Для получения быстрого ответа по идентификации патогена используется метод shotgun-метагеномного секвенирования тотальной ДНК клинического материала, который позволяет получить предварительную информацию о таксономической принадлежности и патогенном потенциале предполагаемого возбудителя (например, возможность выявления ДНК шигелл непосредственно в образцах фекалий пациентов с ОКИ и идентификации генетических маркеров патогенности, включая ген энтеротоксина ShET-2) [23].

Целью данной работы была идентификация и углубленная молекулярно-генетическая характеристика этиологического агента вспышки ОКИ, произошедшей в декабре 2025 г. в пансионате для пожилых людей в Московской области, с применением методологии сочетанного использования метагеномного анализа клинических образцов, полногеномного секвенирования выделенных бактериальных изолятов и их филогенетического анализа.

Материалы и методы

Материалы

Клинические образцы (n = 68) и бактериальные культуры (n = 43), выделенные из клинического материала 24 пациентов с диагнозом ОКИ, получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области» и ГБУЗ Московской области «Домодедовская больница» (табл. 1).

Дизайн исследования

Ретроспективное аналитическое исследование проводили с применением методов молекулярной эпидемиологии (метагеномного анализа клинических образцов и полногеномного секвенирования бактериальных изолятов). В результатах исследования не использованы персональные данные пациентов. На первом этапе проводили shotgun-метагеномное секвенирование тотальной ДНК образцов фекалий, полученных от пациентов, госпитализированных в период вспышки острой кишечной инфекции в декабре 2025 г. На втором этапе исследовали бактериальные изоляты, выделенные из клинического и секционного материала.

Выделение ДНК

Тотальную ДНК из образцов фекалий выделяли модифицированным методом CTAB. Для этого 50 мкл клинического материала суспендировали в 400 мкл буферного раствора

Таблица 1. **Образцы клинического материала и бактериальных культур, исследованные в данной работе**
Table 1. ***Clinical material samples and bacterial cultures examined in this study***

Пациент, пол, возраст / *Patient, gender, age*	Коды образцов / *Sample codes*	Тип образцов / *Sample type*	Источник / *Source*
П1, женский, 84 года / *female, 84 years old*	DE263	Аутопсийный материал / Autopsy material	ND
П2, мужской, 77 лет / *male, 77 years old*	DE264	Аутопсийный материал / Autopsy material	ND
П3, мужской, 79 лет / *male, 79 years old*	DE265, DE308, DE309, DE310, DE311, DE312, DE313, DE314	Аутопсийный материал / Autopsy material	ND, тонкий кишечник, толстый кишечник, содержимое тонкого кишечника, содержимое толстого кишечника, легкие, мозг, селезенка / *ND, small intestine, large intestine, small intestine contents, large intestine contents, lungs, brain, spleen*
П4, женский, 93 года / *female, 93 years old*	DE278, DE279, DE280, DE281, DE282, DE283, DE284, DE285, DE286, DE287, DE288, DE289	Аутопсийный материал / Autopsy material	Тонкий кишечник, содержимое тонкого кишечника, толстый кишечник, содержимое толстого кишечника, кровь, мозг, легкие, трахея, печень, почки, селезенка, миокард / *Small intestine, contents of the small intestine, large intestine, contents of the large intestine, blood, brain, lungs, trachea, liver, kidneys, spleen, myocardium*
П5, мужской, 87 лет / *male, 87 years old*	DE315, DE316, DE317, DE318, DE319, DE320, DE321, DE322, DE323, DE324, DE325, DE326, DE327, DE328, DE329, DE330, DE331, DE332, DE333, DE334, DE335, DE336, DE337, DE338, DE339	Аутопсийный материал / Autopsy material	Тонкий кишечник (верхний), содержимое тонкого кишечника , тонкий кишечник (средний), содержимое тонкого кишечника , тонкий кишечник (нижний), содержимое тонкого кишечника, толстый кишечник (восходящий), содержимое толстого кишечника , толстый кишечник (поперечный), содержимое толстого кишечника , толстый кишечник (нисходящий), содержимое толстого кишечника , толстый кишечник (сигма), содержимое толстого кишечника , толстый кишечник (прямой), содержимое толстого кишечника , мозговые оболочки, кора больших полушарий, легкие, трахея, печень, почка, селезенка, миокард, кровь / *Small intestine (upper), small intestine contents, small intestine (middle), small intestine contents, small intestine (lower), small intestine contents, large intestine (ascending), large intestine contents, large intestine (transverse), large intestine contents, large intestine (descending), large intestine contents, large intestine (sigmoid), large intestine contents, large intestine (rectum), large intestine contents, meninges, cerebral cortex, lungs, trachea, liver, kidney, spleen, myocardium, blood*
	DE498, DE499, DE500, DE501, DE502, DE503, DE504, DE505	Культура / Culture	Аутопсийный материал / *Autopsy material*
П6, мужской, 74 года / *male, 74 years old*	DE416, DE417, DE418, DE419, DE420, DE421, DE422	Аутопсийный материал / Autopsy material	Тонкий кишечник (средний), содержимое тонкого кишечника, толстый кишечник (прямой), содержимое толстого кишечника, мозговые оболочки, легкие, селезенка / *Small intestine (middle section), contents of the small intestine, large intestine (rectum), contents of the large intestine, meninges, lungs, spleen*
	DE506, DE507	Культура / *Culture*	Аутопсийный материал / *Autopsy material*
П7, женский, 85 лет / *female, 85 years old*	DE425, DE426, DE427, DE428, DE429, DE430, DE431	Аутопсийный материал / *Autopsy material*	Тонкий кишечник, толстый кишечник, содержимое тонкого кишечника, содержимое толстого кишечника, легкие, мозговые оболочки, селезенка / *Small intestine, large intestine, contents of the small intestine, contents of the large intestine, lungs, meninges, spleen*
	DE478, DE479	Культура / *Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*
	DE509	Культура / *Culture*	Аутопсийный материал / *Autopsy material*
П8, мужской, 70 лет / *male, 70 years old*	DE432, DE433, DE434, DE435, DE436, DE437, DE438	Аутопсийный материал / *Autopsy material*	Тонкий кишечник, толстый кишечник, содержимое тонкого кишечника, содержимое толстого кишечника, легкие, мозговые оболочки, селезенка / *Small intestine, large intestine, contents of the small intestine, contents of the large intestine, lungs, meninges, spleen*
	DE508	Культура / *Culture*	Аутопсийный материал / *Autopsy material*
П9, нет данных / *ND*	DE369, DE452, DE453	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П10, мужской, 74 года / *male, 74 years old*	DE470, DE471	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П11, женский, 92 года / *female, 92 years old*	DE472, DE473	Культура / *Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*
П12, мужской, 69 лет / *male, 69 years old*	DE474, DE475	Культура / *Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*
П13, женский, ND / *female, ND*	DE476, DE477	Культура / *Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*
П14, женский, 74 года / *female, 74 years old*	DE480, DE481	Культура / *Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*

Таблица 1. **Продолжение /** *Table 1.* ***Continuation***

П15, женский, 87 лет / *female, 87 years old*	DE484, DE485	Культура / *Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*
П16, женский, 77 лет / *female, 77 years old*	DE486	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П17, мужской, 65 лет / *male, 65 years old*	DE487	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П18, женский, 93 года / *female, 93 years old*	DE488	Культура / *Culture*	Кал / Feces
П19, женский, 77 лет / *female, 77 years old*	DE489	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П20, женский, 84 года / *female, 84 years old*	DE490	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П21, женский, 84 года / *female, 84 years old*	DE491	Культура / *Culture*	Кал / *Feces*
П22, женский, ND	DE492	*Культура / Culture*	Ректальный мазок / *Rectal swab*
П23, мужской, ND / *male, ND*	DE493, DE494, DE495, DE496	Культура / *Culture*	Аутопсийный материал / *Autopsy material*
П24, мужской, 79 лет / *male, 79 years old*	DE497	Культура / *Culture*	Аутопсийный материал / *Autopsy material*

1×TE, добавляли 50 мкл раствора лизоцима в концентрации 10 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Далее проводили лизис с использованием SDS и протеиназы K, обработку раствором CTAB/NaCl, экстракцию смесью хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1, осаждение ДНК изопропанолом и промывку 70%-м этанолом. Полученный осадок ДНК растворяли в 15 мкл 1×TE.

Геномную ДНК чистых бактериальных культур выделяли с использованием набора DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка качества ДНК, подготовка библиотек и секвенирование

Концентрацию выделенной ДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора реагентов Spectra Q HS (Raissol Bio, Россия). Целостность ДНК оценивали методом гель-электрофореза.

ДНК фрагментировали с использованием ультразвуковой системы BioRuptor (Diagenode, США). Библиотеки для shotgun-секвенирования подготавливали с применением набора Universal DNA Library Preparation Kit, адаптеров DNA Adapters-96 и магнитных частиц DNA Clean Beads (MGI, Китай). После лигирования адаптеров библиотеки циркуляризовали с использованием Circularization Modul (New England Biolabs, США) и получали ДНК-наноболы. Концентрацию ДНК-наноболов определяли на флуориметре Qubit 4 с использованием набора Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Метагеномное секвенирование

Shotgun-метагеномное секвенирование библиотек тотальной ДНК клинических образцов и полногеномное секвенирование библиотек ДНК бактериальных изолятов проводили на платформе DNBSEQ-G99 (MGI Tech, Китай) в режиме парно-концевого секвенирования PE150, в соответствии с протоколом производителя.

Биоинформатический анализ метагеномных данных

Адаптерные последовательности удаляли из исходных прочтений с использованием программы Trimmomatic (https://github.com/usadellab/Trimmomatic, дата обращения: 04.08.2026). Таксономическую классификацию очищенных прочтений проводили с помощью Kraken2 (https://github.com/DerrickWood/kraken2, дата обращения: 04.08.2026) с последующей обработкой результатов программой Bracken (https://github.com/jenniferlu717/Bracken, дата обращения: 04.08.2026). Прочтения, отнесенные к наиболее представленным бактериальным таксонам, извлекали с использованием набора утилит KrakenTools (https://github.com/jenniferlu717/KrakenTools, дата обращения: 04.08.2026). Относительную представленность каждого бактериального таксона рассчитывали, как долю прочтений, отнесенных к соответствующему таксону, от общего числа прочтений, классифицированных как бактериальные. Результаты таксономического анализа представляли в виде таблиц и круговых диаграмм.

Сборка геномов, оценка качества и видовая идентификация

Геномные последовательности собирали de novo из очищенных парно-концевых прочтений с использованием программы Unicycler v. 0.5.1 (https://github.com/rrwick/Unicycler, дата обращения: 04.08.2026). Качество полученных сборок оценивали с помощью CheckM2 (https://github.com/chklovski/CheckM2, дата обращения: 04.08.2026); учитывали показатели полноты и контаминации сборок.

Первичную таксономическую идентификацию изолятов проводили с использованием Kraken2 (https://github.com/DerrickWood/kraken2, дата обращения: 04.08.2026) с последующей обработкой результатов программой Bracken (https://github.com/jenniferlu717/Bracken, дата обращения: 04.08.2026). Видовую принадлежность изолятов дополнительно оценивали на основании средней нуклеотидной идентичности геномов, рассчитанной с помощью программы skani (https://github.com/bluenote-1577/skani, дата обращения: 04.08.2026). Все программы запускали с параметрами по умолчанию.

Генотипирование и серотипирование изолятов *S. flexneri*

Мультилокусное сиквенс-типирование собранных геномов *S. flexneri* проводили *in silico* с использованием программы

Таблица 2. **Количественные характеристики метагеномного секвенирования и таксономической классификации прочтений клинических образцов, полученных от пациентов**
Quantitative characteristics of metagenomic sequencing and taxonomic classification of reads from clinical samples obtained from patients

Проба / *Sample*	DE263	DE264	DE265
Общее количество прочтений (ридов) / *Total number of reads*	18 284 071	28 245 877	18 284 071
Количество прочтений, отнесенных к бактериям / *Number of reads assigned to bacteria*	62 740	563 266	690 282
Доля бактериальных прочтений от общего числа прочтений, % / *Proportion of bacterial reads out of the total number of reads, %*	0,34	1,99	1,566
Доля наиболее представленных бактериальных таксонов / *Proportion of the most abundant bacterial taxa*	60% *S. flexneri* 27% *E. coli*	38% *S. flexneri.* 28% *E. coli*	19% *S. flexneri* 19% *E. coli*

MLST (https://github.com/tseemann/mlst, дата обращения: 04.08.2026). Серотипирование геномных сборок выполняли с помощью программы ShigaPass (https://github.com/imanyass/ShigaPass, дата обращения: 04.08.2026). Обе программы запускали с параметрами по умолчанию.

Анализ резистомов и вируломов

Идентификацию генетических детерминант антибиотикорезистентности и факторов патогенности в сборках геномов *S. flexneri* проводили *in silico* с использованием программы ABRicate (https://github.com/tseemann/ABRICATE, дата обращения: 04.08.2026) и баз данных NCBI и VFDB. Для выявления генов экзотоксинов применяли картирование исходных прочтений на референсные последовательности, полученные из раздела VFDB/Shigella/Exotoxin (https://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Shigella, дата обращения: 04.08.2026). Отобранные последовательности объединяли в файл VF_Shigella_Exotoxins.fasta. Картирование прочтений выполняли с использованием программы minimap (https://github.com/lh3/minimap, дата обращения: 04.08.2026). Полученные результаты конвертировали и индексировали с помощью SAMtools (https://github.com/samtools/samtools, дата обращения: 04.08.2026), а статистику по каждой референс-последовательности получали командой samtools idxstats. Визуализацию результатов выполняли с использованием собственного скрипта, написанного на языке Python (https://www.python.org, дата обращения: 04.08.2026). Программы запускали с параметрами по умолчанию.

Филогенетический анализ

Оценку эволюционного расстояния между близкородственными геномами осуществляли с помощью алгоритма andi (https://github.com/EvolBioInf/andi, дата обращения: 04.08.2026) и snp-dist (https://github.com/tseemann/snp-dists, дата обращения: 04.08.2026). Филогенетическое дерево строили с помощью метода BIONJ (https://github.com/achtman-lab/GrapeTree, дата обращения: 04.08.2026). Дополнительно проведен филогенетический анализ на основе 53 геномов *S. flexneri*, размещенных в Национальном каталоге коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов.

Результаты исследования и их обсуждение

Метагеномный анализ клинических образцов

Метагеномное shotgun-секвенирование тотальной ДНК трех клинических образцов выявило присутствие последовательностей, таксономически отнесенных к *S. flexneri*, во всех исследованных пробах. Доля прочтений, отнесенных к *S. flexneri*, среди бактериальных последовательностей составила 60% DE263, 38% в DE264 и 19% в DE265. Во всех трех образцах также были выявлены последовательности *E. coli*, доля которых составила соответственно 27; 28 и 19%. Таким образом, в пробах DE263 и DE264 ДНК *S. flexneri* являлась наиболее представленной среди идентифицированных последовательностей ДНК, тогда как в образце DE265 доли ДНК *S. flexneri* и *E. coli* были сопоставимы (табл. 2, рис. 1).

Полногеномное секвенирование и характеристика геномных сборок

Полногеномное секвенирование выполнено для 26 бактериальных изолятов, полученных из клинического и секционного материала от 18 пациентов. Для всех образцов были сформированы геномные сборки. Оценка качества с использованием CheckM2 показала полноту сборок 100% при уровне контаминации от 0,20 до 0,81%. Размер сборок варьировал от 3,80 до 5,27 млн п.н., а число контигов – от 36 до 603. GC-состав всех сборок составлял ~51%. Согласно результатам оценки качества сборок, их полнота составила 100%, а уровень контаминации варьировал от 0,20 до 0,81%. Размер

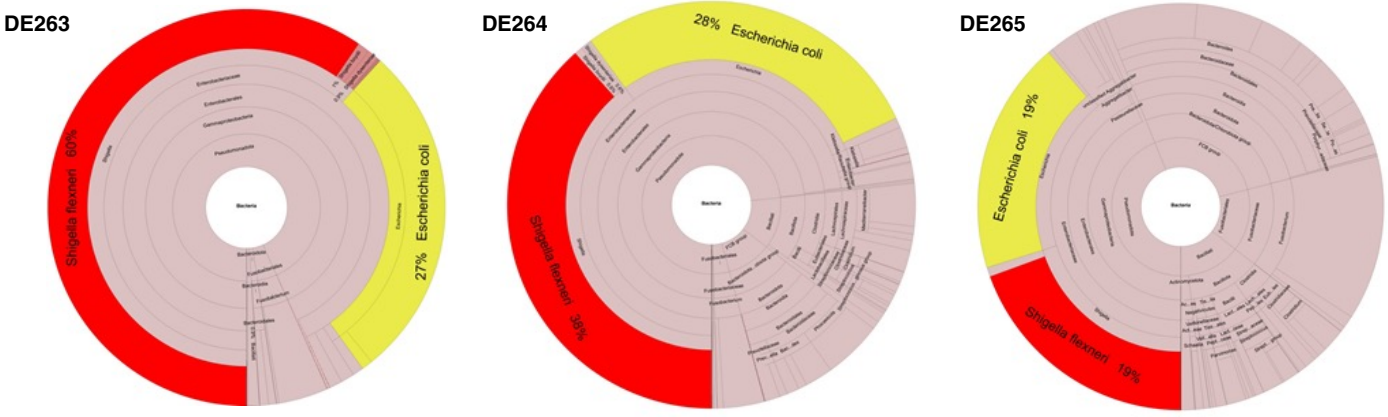


Рис. 1. **Визуализация относительной представленности бактериальных таксонов в клинических образцах с помощью программы Krona. Красным цветом выделена доля прочтений, отнесенных к *S. flexneri*, желтым – к *E. coli*.**
Fig. 1. ***Visualization of the relative abundance of bacterial taxa in clinical samples using the Krona software. The proportion of reads assigned to S. flexneri is highlighted in red, and those assigned to E. coli in yellow.***

Таблица 3. **Количественные характеристики результатов полногеномного секвенирования ДНК 26 изолятов *S. Flexneri***
Table 3. ***Quantitative characteristics of the whole-genome DNA sequencing results for 26 S. flexneri isolates***

Наименование образца	Полнота, %	Контаминация, %	Размер генома, п.н.	ГЦ-состав, %	Кол-во контигов
DE311	100	0,81	5 271 720	51	349
DE319	100	0,2	5 102 948	51	181
DE331	100	0,21	5 103 128	51	181
DE337	100	0,21	5 104 481	51	177
DE470	100	0,21	5 104 942	51	185
DE472	100	0,21	3 804 211	51	36
DE474	100	0,36	4 506 782	51	597
DE476	100	0,39	4 520 341	51	579
DE478	100	0,39	4 546 381	51	500
DE480	100	0,39	4 520 821	51	579
DE482	100	0,35	4 506 000	51	603
DE484	100	0,39	4 546 633	51	504
DE492	100	0,36	4 506 717	51	601
DE493	100	0,39	4 546 419	51	503
DE497	100	0,39	4 547 288	51	500
DE498	100	0,39	4 547 702	51	501
DE506	100	0,39	4 547 963	51	506
DE508	100	0,39	4 519 859	51	576
DE509	100	0,39	4 546 937	51	499
DE369	100	0,37	4 521 622	51	577
DE452	100	0,39	4 529 633	51	536
DE453	100	0,39	4 546 663	51	507
DE263	100	0,39	4 546 938	51	503
DE264	100	0,39	4 546 601	51	509
DE280	100	0,39	4 546 853	51	499
DE281	100	0,42	4 519 645	51	583

сборок находился в диапазоне от 3 804 211 до 5 271 720 п.н., GC-состав для всех образцов был указан как 51%. Число контигов варьировало от 36 до 603 (табл. 3).

Для большинства исследованных изолятов размер геномной сборки составлял приблизительно 4,5 млн п.н. Вместе с тем для отдельных образцов наблюдались существенные отклонения от этого диапазона: размер сборки DE472 составил 3,80 млн п.н., тогда как для DE311, DE319, DE331, DE337 и DE470 он превышал 5,10 млн п. н.

Видовая идентификация, основанная на анализе полногеномных последовательностей программой Kraken2 и последующей пост-обработкой программой Braken, выявила в 26 образцах ДНК возбудителя дизентерии *S. flexneri* (табл. 4).

Серотипирование и MLST-генотипирование изолятов *S. flexneri*

Серотипирование *in silico* показало принадлежность всех изолятов к серотипу 2a, а MLST – к сиквенс-типу ST245 с аллельным профилем *adk6, fumC61, gyrB6, icd11, mdh13, purA3* и *recA50*.

Анализ резистома изолятов *S. flexneri*

Во всех геномах изолятов S. flexneri идентифицированы генетические детерминанты, ассоциированные с устойчивостью к β-лактамам (bla_{EC-8}, bla_{OXA-1} и *blaCTX-M-15*), хлорамфениколу (*catA1*), стрептотрицину (*sat2*), триметоприму (*dfrA1*), тетрациклину (*tetB*) и хинолонам (*qnrS1*).

Анализ вирулома изолятов *S. flexneri*

Биоинформатический анализ геномов изолятов *S. flexneri* с применением алгоритма «Вирулом» Национального каталога коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов, разработанного ФБУН ГНЦ ПМБ, выявил у всех изолятов наличие генов, кодирующих факторы патогенности *S. flexneri*, характерных для серотипа 2a: *ipaBCDH* (оперон, кодирующий белки-эффекторы, играющие центральную роль в проникновении патогена внутрь клеток хозяина), *virA* (белок-эффектор, который играет роль в колонизации и инвазии кишечника), *set1AB* (гены кодирующие субъединицы энтеротоксина ShET-1). Генов *stxAB* (гены, кодирующие субъединицы шигатоксина) не обнаружено.

Филогенетический анализ изолятов *S. flexneri*

Дополнительно проведенный филогенетический анализ на основе 53 геномов *S. flexneri*, размещенных в Национальном каталоге коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов, графически показал, что изучаемые изоляты

Таблица 4. **Видовая идентификация 26 изолятов *S. flexneri***
Table 4. ***Species identification of 26 S. flexneri isolates***

Наименование образца	Вид	Kraken, %	Braken, %	ANI, %
DE311	*S. flexneri*	55,27	94,48	96,72
DE319	*S. flexneri*	59,6	94,29	96,86
DE331	*S. flexneri*	55,44	94,44	96,89
DE337	*S. flexneri*	53,57	94,14	96,86
DE470	*S. flexneri*	54,1	94,29	96,65
DE472	*S. flexneri*	59,14	94,52	96,87
DE474	*S. flexneri*	57,04	93,66	96,72
DE476	*S. flexneri*	53,49	94,25	96,65
DE478	*S. flexneri*	54,3	94,43	96,72
DE480	*S. flexneri*	53,58	94,31	96,64
DE482	*S. flexneri*	59,84	94,69	96,66
DE484	*S. flexneri*	59,8	94,42	96,68
DE492	*S. flexneri*	59,68	94,44	96,75
DE493	*S. flexneri*	59,49	94,49	96,66
DE497	*S. flexneri*	55,38	94,28	96,73
DE498	*S. flexneri*	59,72	94,68	96,89
DE506	*S. flexneri*	55,46	94,16	96,69
DE508	*S. flexneri*	57,09	93,63	96,72
DE509	*S. flexneri*	59,37	94,47	96,66
DE369	*S. flexneri*	59,72	94,49	96,73
DE452	*S. flexneri*	57,04	94,49	96,89
DE453	*S. flexneri*	53,85	94,03	96,72
DE263	*S. flexneri*	59,44	94,68	96,87
DE264	*S. flexneri*	59,33	94,48	96,72
DE280	*S. flexneri*	59,92	94,89	96,68
DE281	*S. flexneri*	55,23	94,33	96,72

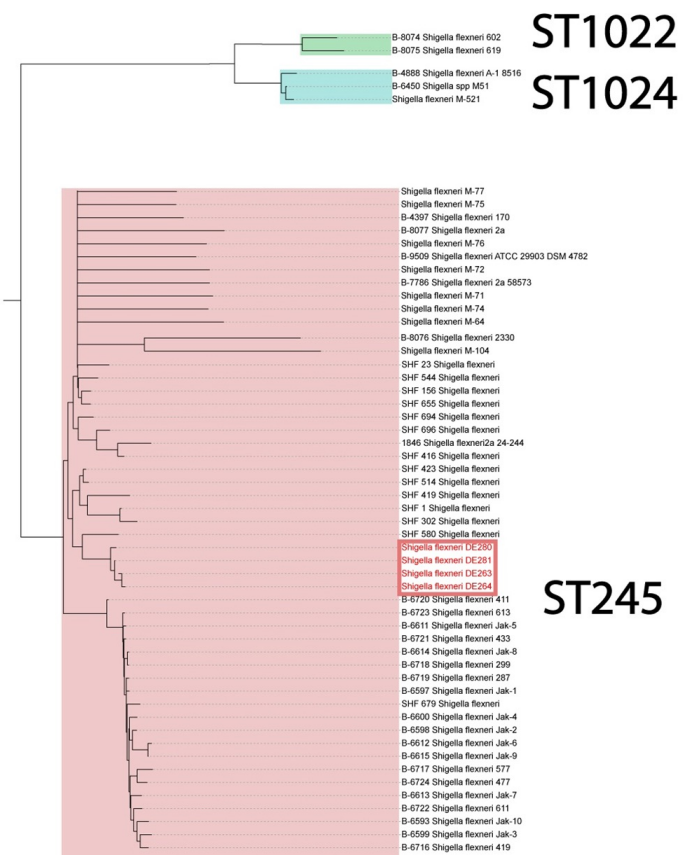


Рис. 2. **Филогенетическое дерево на основе 53 геномов штаммов *S. flexneri*, депонированных в Национальный каталог коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов. Красным цветом отображены изучаемые изоляты.**
Fig. 2. ***Phylogenetic tree based on 53 genomes of S. flexneri strains deposited in the National Catalog of Collection Strains of Pathogenic Microorganisms and Viruses. The isolates under study are shown in red.***

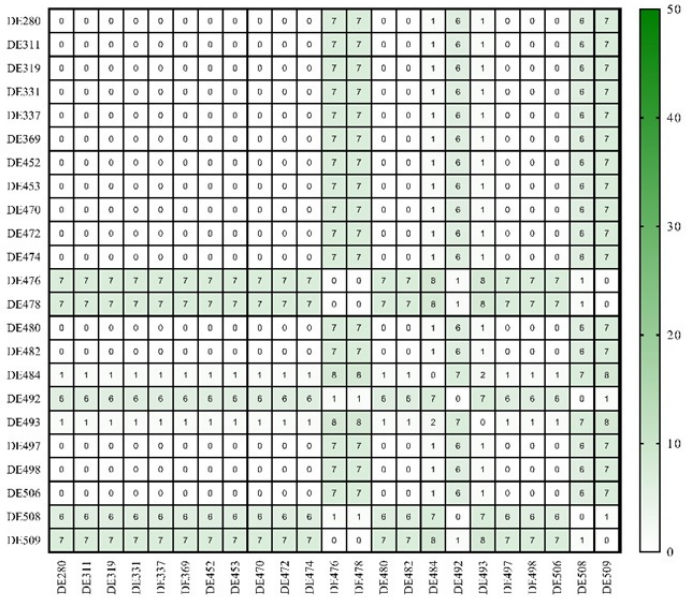


Рис. 3. **Матрица попарных генетических расстояний на основе SNP, интенсивность зеленого цвета отображает степень генетических различий между изолятами *S. flexneri*.**
Fig. 3. ***Matrix of pairwise genetic distances based on SNPs; the intensity of the green color reflects the degree of genetic divergence between S. flexneri isolates.***

(DE280, DE281, DE263, DE264) располагаются среди наиболее распространенного геновариант ST245 (рис. 2).

Дополнительно вычислена матрица попарных генетических расстояний на основе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (рис. 3).

Попарное сравнение изучаемых геномов изолятов *S. flexneri* показало их высокую степень родства (SNP ≤8), что указывает на моноклональный характер изучаемой вспышки шигеллеза.

Обсуждение

В декабре 2025 г. в пансионате для пожилых людей, расположенном в д. Дроздово Ленинского городского округа Московской области, была зарегистрирована вспышка ОКИ. По данным Видновской городской прокуратуры, по состоянию на 18 декабря в пансионате находились 73 постояльца в возрасте от 51 до 97 лет; впоследствии 44 из них были госпитализированы в медицинские организации Московской области [24]. Масштаб вспышки обусловил необходимость оперативной идентификации и предварительной характеристики возбудителя непосредственно в клиническом материале, до завершения выделения чистых культур.

С помощью метагеномного анализа трех образцов клинического материала от умерших пациентов было показано, что среди всей бактериальной ДНК в образцах наиболее представлена (19–60%) была ДНК бактерий *S. flexneri*, что позволило сделать вывод о шигеллезной природе данной вспышки ОКИ. Аналогичный алгоритм расследования вспышки кишечной инфекции был описан ранее в работе, описывающей вспышку шигеллеза во Вьетнаме в 2024 г. [25].

Полногеномное секвенирование 26 изолятов *S. flexneri*, выделенных из клинического и секционного материала от 18 пациентов, с последующим филогенетическим анализом и SNP-анализом, показало высокую степень родства изолятов между собой (SNP ≤8). Серотипирование *in silico* показало принадлежность всех изолятов к серотипу 2a, а MLST – к сиквенс-типу ST245. Генетическая линия *S. flexneri* ST245 является самой распространенной среди геномов данного патогена во многих странах на всех континентах, при этом ~93% изолятов серотипа 2a ассоциированы именно с ST245 [26].

Во всех геномах изолятов *S. flexneri* идентифицированы генетические детерминанты, ассоциированные с устойчивостью к β-лактамам (bla_{EC-8}, bla_{OXA-1} и *blaCTX-M-15*), хлорамфениколу (*catA1*), стрептотрицину (*sat2*), триметоприму (*dfrA1*), тетрациклину (*tetB*) и хинолонам (*qnrS1*). Полученные данные согласуются с тем, что в настоящее время почти половина всех штаммов *Shigella* spp. в мире являются мультирезистентными (MDR), что серьезно ограничивает эффективность лечения вызванных ими инфекций [27].

Высокий патогенетический потенциал данной генетической линии ассоциирован с выявленными у всех изолятов генами, кодирующими факторы патогенности *S. flexneri*, характерные для серотипа 2a: *ipaBCDH* (оперон, кодирующий белки-эффекторы, играющие центральную роль в проникновении патогена внутрь клеток хозяина), *virA* (белок-эффектор, который играет роль в колонизации и инвазии кишечника), *set1AB* (гены, кодирующие субъединицы энтеротоксина ShET-1). Аналогичные вируломы *S. flexneri* описаны в недав-

ней работе китайских исследователей и рассматриваются ими как нарастающая угроза, связанная с увеличением тяжести инфекций, вызванных такими патогенами [28].

Заключение

Таким образом, сочетание метагеномного анализа клинических образцов с полногеномным секвенированием выделенных изолятов позволило в данном исследовании идентифицировать и охарактеризовать молекулярно-генетические свойства возбудителя вспышки ОКИ среди пациентов дома престарелых в Московской области в 2025 г. Ограничением данного исследования является отсутствие анализа образцов пищевых продуктов или других материалов, который позволил бы установить первоисточник данной инфекции.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках НИОКР М 1.18 по Госзаданию в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ.

Funding

The work was carried as part of R&D M 1.18 under a State Assignment at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology ona unique scientific facility of the SRCAMB.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Ram PK, Crump JA, Gupta SK, Miller MA, Mintz ED. Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. Epidemiol Infect. 2008;136(5):577-603. DOI: 10.1017/S0950268807009351
2. Hausdorff WP, Anderson JD 4th, Bagamian KH, Bourgeois AL, Mills M, Sawe F, et al. Vaccine value profile for *Shigella*. Vaccine. 2023;41 Suppl 2:S76-S94. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.12.037
3. Hendrick J, Raqib R, Noor Z, Faruque ASG, Haque R, Petri WA. Shigellosis. Lancet. 2025;406(10511):1508-1519. DOI: 10.1016/S0140-6736(25)01033-5
4. Dupont HL, Hornick RB, Dawkins AT, Snyder MJ, Formal SB. The response of man to virulent *Shigella flexneri* 2a. J Inf Dis. 1969;119:296-299. DOI: 10.1093/infdis/119.3.296
5. Binkhamis K, Alangari S, Juma F, Althawadi S, Al-Qahtani AA, Bohol MFF, et al. *Shigella flexneri* Outbreak at a Rehabilitation Center: First Report from Saudi Arabia. Healthcare (Basel). 2025;13(9):971. DOI: 10.3390/healthcare13090971
6. World Health Organization. WHO bacterial priority pathogens list, 2024. Geneva: WHO; 2024.
7. Neemuchwala A, Johnson K, Cronin K, Zittermann S, Peralta A, Allen VG, et al. Characterization of azithromycin-rsistant *Shigella flexneri* serotype 2a isolates using whole genome sequencing in Ontario from 2016 to 2018. Microbiol Spectr. 2024;12(10):e0070624. DOI: 10.1128/spectrum.00706-24
8. Guglielmino CJD, Kakkanat A, Forde BM, Rubenach S, Merone L, Stafford R, et al. Outbreak of multi-drug-resistant (MDR) *Shigella flexneri* in northern Australia due to an endemic regional clone acquiring an IncFII plasmid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40(2):279-286. DOI: 10.1007/s10096-020-04029-w
9. Shrum Davis S, Salazar-Hamm P, Edge K, Hanosh T, Houston J, Griego-Fisher A, et al. Multidrug-resistant *Shigella flexneri* outbreak affecting humans and non-human primates in New Mexico, USA. Nat Commun. 2025;16(1):4680. DOI: 10.1038/s41467-025-59766-3
10. Ranjbar R, Farahani A. *Shigella*: Antibiotic-Resistance Mechanisms And New Horizons For Treatment. Infect Drug Resist. 2019;12:3137-3167. DOI: 10.2147/IDR.S219755
11. Ranganathan S, Doucet M, Grassel CL, Delaine-Elias B, Zachos NC, Barry EM. Evaluating *Shigella flexneri* pathogenesis in the human enteroid model. Infect Immun. 2019;87(4):e00740-18. DOI: 10.1128/IAI.00740-18
12. Kago G, Turnbough CL Jr, Salazar JC, Payne SM. (p)ppGpp is required for virulence of *Shigella flexneri*. Infect Immun. 2024;92(1):e00334-23. DOI: 10.1128/iai.00334-23
13. Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, et al. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of *Ipa* protein secretion and efficient insertion of *IpaB* and *IpaC* into host membranes. Infect Immun. 2005 Mar;73(3):1432-40. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1432-1440.2005
14. Bergounioux J, Elisee R, Prunier AL, Donnadieu F, Sperandio B, Sansonetti P, et al. Calpain activation by the *Shigella flexneri* effector VirA regulates key steps in the formation and life of the bacterium's epithelial niche. Cell Host Microbe. 2012;11(3):240-52. DOI: 10.1016/j.chom.2012.01.013
15. Fasano A, Noriega FR, Maneval DR Jr, Chanasongcram S, Russell R, Guandalini S, et al. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. J Clin Invest. 1995;95(6):2853-61. DOI: 10.1172/JCI117991
16. Yassine I, Hansen EE, Lefèvre S, Ruckly C, Carle I, Lejay-Collin M, et al. ShigaPass: an *in silico* tool predicting *Shigella* serotypes from whole-genome sequencing assemblies. Microb Genom. 2023;9(3):mgen000961. DOI: 10.1099/mgen.0.000961
17. Sadredinamin M, Shabani M, Karimi A, Sohrabi MR, Karimi-Yazdi M, Ghalavand Z, et al. Virulence genes expression profiling of different *Shigella flexneri* serotypes

in response to sub-inhibitory concentrations of azithromycin and ciprofloxacin. Gut Pathog. 2022 Feb 22;14(1):10. DOI: 10.1186/s13099-022-00483-3

18. Bengtsson RJ, Simpkin AJ, Pulford CV, Low R, Rasko DA, Rigden DJ, et al. Pathogenomic analyses of *Shigella* isolates inform factors limiting shigellosis prevention and control across LMICs. Nat Microbiol. 2022;7(2):251-261. DOI: 10.1038/s41564-021-01054-z
19. Fan W, Qian H, Shang W, Ying C, Zhang X, Cheng S, et al. Low distribution of genes encoding virulence factors in *Shigella flexneri* serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations. Gut Pathog. 2017;9:76. DOI: 10.1186/s13099-017-0222-9
20. Ko KKK, Chu JJK, Lim KM, Yingtaweesittikul H, Huang W, Tan SYL, et al. Clonal serotype 1c multidrug-resistant *Shigella flexneri* detected in multiple institutions by sentinel-site sequencing. Front Med (Lausanne). 2022;9:964640. DOI: 10.3389/fmed.2022.964640
21. Bernaquez I, Gaudreau C, Pilon PA, Bekal S. Evaluation of whole-genome sequencing-based subtyping methods for the surveillance of *Shigella* spp. and the confounding effect of mobile genetic elements in long-term outbreaks. Microb Genom. 2021;7(11):000672. DOI: 10.1099/mgen.0.000672
22. Connor TR, Barker CR, Baker KS, Weill FX, Talukder KA, Smith AM, et al. Species-wide whole genome sequencing reveals historical global spread and recent local persistence in *Shigella flexneri*. Elife. 2015;4:e07335. DOI: 10.7554/eLife.07335
23. Liu J, Almeida M, Kabir F, Shakoor S, Qureshi S, Zaidi A, et al. Direct detection of *Shigella* in stool specimens by use of a metagenomic approach. J Clin Microbiol. 2018;56(2):e01374-17. DOI: 10.1128/JCM.01374-17
24. Available at: https://epp.genproc.gov.ru/ru/proc_50/mass-media/news/regional/e8334618/ (date of access: 27.07.2026).
25. Dao TK, Pham TTN, Nguyen HD, Dam QT, Phung TBT, Nguyen TVH, et al. Metagenomic analysis of the gastrointestinal phageome and incorporated dysbiosis in children with persistent diarrhea of unknown etiology in Vietnam. Pathogens. 2025;14(10):985. DOI: 10.3390/pathogens14100985
26. Tao J, Liu Y, Jiang X, Song X, Zhang X, Song Y, et al. Global distribution and genomic characteristics of *Shigella*: A genomic epidemiological study. Infect Med (Beijing). 2026;5(3):100268. DOI: 10.1016/j.imj.2026.100268
27. Bose P, Halder G, Kayet P, Chowdhury G, Basak S, Roy D, et al. Escalation of CTX-M-producing extensively drug-resistant *Shigella* spp. in Kolkata, India, following the COVID-19 pandemic. Microbiol Spectr. 2026 Jul 24:e0282425. DOI: 10.1128/spectrum.02824-25
28. Zhang Y, Wang X, Liang Y, Wang W, Huang H, Yang B, et al. Epidemiological Characteristics, Antibiotic Resistance Patterns and Genomic Analysis of *Shigella* Isolated in Pudong, Shanghai During 2013–2024. Antibiotics (Basel). 2025 Oct 30;14(11):1091. DOI: 10.3390/antibiotics14111091

Информация о соавторах:

Соломенцев Виктор Иванович, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0006-5151-1566

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

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-5829-0512

Детушев Константин Владимирович, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6311-8856

Волков Даниил Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0009-6890-4704

Сизова Анжелика Алексеевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-8529-8405

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7521-1641

Теймуразов Марат Георгиевич, кандидат биологических наук, ведущий 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
ORCID: 0009-0006-5151-1566

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, заместитель директора по лабораторной деятельности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-2006-9131

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1078-4585

Information about co-authors:

Victor I. Solomentsev, Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0006-5151-1566

Lidia A. Shishkina, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Genomic Research of Culture Collection Department,, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anastasia Yu. Lebedeva, Junior Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Tatiana N. Mukhina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-5829-0512

Konstantin V. Detushev, Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6311-8856

Daniil V. Volkov, Junior Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0009-6890-4704

Anzhelika A. Sizova, Junior Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-8529-8405

Irina P. Mitsevich, Senior Researcher, Laboratory of Antimicrobial Drugs, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7521-1641

Marat G. Teimurazov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Antimicrobial Drugs, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Maria A. Evseeva, Junior Researcher, Laboratory of Antimicrobial Drugs, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0006-5151-1566

Nikolay N. Kartsev, PhD, MD, Deputy Director for Laboratory Activities, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-2006-9131

Ivan A. Dyatlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1078-4585

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 68–74
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 68–74

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-68-74

Разработка латексного иммунохроматографического теста для экспресс-выявления холерного токсина

А.Г.Королёва-Ушакова, Е.В.Баранова, А.Г.Шевяков, В.А.Яковлева, Е.А.Панфёрцев, Т.В.Решетняк, А.А.Баранова, А.Г.Волошин, А.А.Горбатов, С.Ф.Бикетов

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

Холерный токсин является основным фактором патогенности холерного вибриона *Vibrio cholerae*. Диагноз холеры ставится на основании клинических симптомов и микробиологических исследований клинического материала. Однако в условиях низкой лабораторной оснащенности и территориальной удаленности от диагностических медицинских учреждений для предварительной диагностики целесообразно применение экспрессных тестов для прямого обнаружения холерного токсина. В данном исследовании мы предприняли попытку сконструировать иммунохроматографический тест, выявляющий холерный токсин за 15 мин. Для этого были получены оригинальные моноклональные антитела к рекомбинантной В-субъединице холерного токсина. Конъюгаты антител с латексными микросферами были использованы для конструирования экспериментальных тестов, выявляющих холерный токсин за 15 мин.

Ключевые слова: холерный токсин, белок CTXB, Vibrio cholerae, моноклональные антитела, иммунохроматографический тест, латексные микросферы

Для цитирования: Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Шевяков А.Г., Яковлева В.А., Панфёрцев Е.А., Решетняк Т.В., Баранова А.А., Волошин А.Г., Горбатов А.А., Бикетов С.Ф. Разработка латексного иммунохроматографического теста для экспресс-выявления холерного токсина. Бактериология. 2026; 11(3): 68–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-68-74

Development of a latex immunochromatographic test for the rapid detection of cholera toxin

A.G.Korolyova-Ushakova, E.V.Baranova, A.G.Shevyakov, V.A.Yakovleva, E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, A.A.Baranova, A.G.Voloshin, A.A.Gorbatov, S.F.Biketov

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

Cholera toxin is the primary virulence factor of pathogenic *Vibrio cholerae* strains. A definitive diagnosis of cholera is established through microbiological analysis of clinical samples. However, in settings with limited laboratory facilities or significant distance from diagnostic medical centers, the use of rapid diagnostic tests is advantageous. In this study, we developed an immunochromatographic test system for the detection of cholera toxin using monoclonal antibodies raised against purified recombinant CTXB protein and conjugated to latex microspheres.

Key words: cholera toxin, белок CTXB, Vibrio cholerae, monoclonal antibodies, immunochromatographic test, latex microspheres

For citation: Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Shevyakov A.G., Yakovleva V.A., Panfertsev E.A., Reshetnyak T.V., Baranova A.A., Voloshin A.G., Gorbatov A.A., Biketov S.F. Development of a latex immunochromatographic test for the rapid detection of cholera toxin. Bacteriology. 2026; 11(3): 68–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-68-74

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147

Статья поступила 01.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

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

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147

The article was received 01.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

Холера – острая диарейная инфекция, развивается в случае попадания токсигенных штаммов возбудителя *Vibrio cholerae* серогрупп O1 или O139 в организм с зараженными пищевыми продуктами или водой. При отсутствии лечения может за считаные часы закончиться смертельным исходом. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в мире ежегодно происходит от 1,3 до 4,0 млн случаев заражения холерой, включая 21 000–143 000 случаев со смертельным исходом [1].

V. cholerae классифицируется на основе различий в структуре О-антигена его липополисахарида. *V. cholerae* O1 делится на два основных серотипа: Инаба и Огава, которые различаются наличием одной метильной группы на полисахаридном антигене Огава-О. *V. cholerae* O1 также делится на два биотипа: Эль-Тор и классический; они различаются биохимическими особенностями и восприимчивостью к определенным бактериофагам [2].

Холерный токсин (ХТ) является основным фактором патогенности *V. cholerae*, который при взаимодействии с энтероцитами активирует внутриклеточную аденилатциклазу, что приводит к гиперсекреции жидкости в тонкий кишечник и вызывает резкое обезвоживание и потерю натрия, хлорида, бикарбоната и калия [3]. ХТ кодируется опероном ctxAB, который является частью генетического элемента CTX. ХТ, имеющий две субъединицы – A и B, представляет собой белок массой 84 кДа. Субъединица А отвечает за фенотип заболевания, в то время как субъединица В обеспечивает доставку субъединицы А к клеткам-мишеням путем катализа АДФ (аденозиндифосфат)-рибозилирования, что приводит к активации аденилатциклазы и повышению внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Повышение внутриклеточного уровня цАМФ приводит к нарушению усвоения натрия и увеличению оттока хлорида, вызывая выделение воды и диарею [4].

Для подтверждения диагноза холеры требуется комплекс лабораторных исследований [5]. Диагноз обычно ставится на основании культивирования возбудителя из клинического образца. *V. cholerae* можно выделить из клинического материала с использованием селективных сред, таких как тиосульфат-цитратный желчно-сахарозный агар или таурохолат-теллурит-желатиновый агар. После культивирования *V. cholerae* можно идентифицировать с помощью биохимических тестов; серогруппу и серотип можно определить с помощью тестирования со специфическими антителами [6]. Традиционные методы культивирования для выделения и идентификации *V. cholerae* могут занимать ≥3 дней, а также требуют хорошей лабораторной инфраструктуры и квалифицированного персонала. Данные факторы могут вызвать отсрочку постановки верного диагноза и иметь ряд последствий, включая неэффективные противоэпидемические меры, распространение заболевания, увеличение заболеваемости и смертности. Дополнительным полезным инструментом раннего выявления вероятных вспышек холеры являются диагностические экспресс-тесты. Одним из таких тестов является мембранный иммунохроматографический (ИХ) тест на основе моноклональных антител (МКА) к ХТ [7, 8]. Значимость данных тестов при масштабных обследованиях трудно переоценить благодаря высоким показателям чувствительности, специфичности, скорости получения результатов и, что немаловажно, возможности использования в отдаленных районах с ограниченными лабораторными ресурсами [9, 10].

Цель исследования: получить компоненты иммунохроматографического теста и сконструировать латексный иммунохроматографический тест для экспресс-выявления холерного токсина.

Материалы и методы

В работе использовали микробиологические, биохимические, иммунохимические методы, методы молекулярной биологии и гибридомной технологии. Материалом для исследований явились МКА к ХТ и конъюгаты этих антител с частицами латексных микросфер.

Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител

Для получения МКА использовали самок мышей линии BALB/c в возрасте 6–8 нед. (массой 18–20 г), содержавшихся в виварии ФБУН ГНЦ ПМБ со свободным доступом к пище и воде. Мышей иммунизировали очищенным рекомбинантным белком rCTXB.

Конструирование штамма-продуцента субъединицы холерного токсина CTXB

Фрагмент ДНК размером 372 п.о., кодирующий синтез субъединиц CTXB, был получен амплификацией методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ДНК-матрицы клинического штамма *V. cholerae* 569B и клонирован в составе экспрессирующего плазмидного вектора pET32b традиционным рестриктазно-лигазным методом таким образом, чтобы в результате работы получить 6-his-меченный на С-конце рекомбинантный CTXB-протеин. Штамм-продуцент рекомбинантного белка CTXB был получен трансформацией компетентных клеток штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) [F– ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm (DE3)], несущего ген T7 РНК полимеразы под контролем ИПТГ-индуцибельного lacUV5 промотора (Novagen, США) рекомбинантной плазмидной ДНК pETCTXBNX. Рекомбинантный 6-his-меченный CTXb-протеин выделяли из индуцированной ИПТГ биомассы штаммов-продуцентов с последующей аффинной очисткой на металло-хелатном сорбенте. Очищенным рекомбинантным CTXB иммунизировали лабораторных животных.

Иммунизация животных

Первая инъекция включала 50 мкг антигена подкожно в эмульсии с полным адъювантом Фрейнда (Sigma, США). Последующие иммунизации проводили на 14-й и 28-й дни тем же количеством антигена в неполном адъюванте Фрейнда (Sigma, США). Титр специфических антител в сыворотке крови мышей оценивали методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на 35-й день. Животному с наибольшим титром специфических антител за 3 дня до гибридизации внутривенно вводили бустерную дозу антигена – 10 мкг в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

Получение гибридом

Гибридизацию спленоцитов иммунизированной мыши с клетками мышиной миеломы линии Sp2/0-Ag14 проводили

по классическому методу Мильштейна и Келера с модификациями. Слияние клеток осуществляли в соотношении 5:1 (спленоциты:миелома) с использованием 50%-го раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ 4000, Merc, США) в присутствии 5% диметилсульфоксида при температуре 37°С. После слияния клетки суспендировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, HyClone, США), и высевали в 96-луночные культуральные планшеты. Селекцию гибридных клонов проводили в среде с добавлением ГАТ – селективной среде, содержащей 0,1 мМ гипоксантина, 0,4 мкм аминоптерина, 16 мкМ тимидина (Sigma, США).

Скрининг и клонирование специфических гибридом

Первичный скрининг антителопродуцирующих гибридом проводили на 10–14-й день после слияния методом непрямого ИФА. Для этого в лунки 96-луночного планшета (Nunc, Германия) сорбировали рекомбинантный rCTXB (10 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9,6). В качестве вторичных антител использовали козьи антитела против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена («ИМТЕК», Россия). Визуализацию проводили с использованием субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ).

Клетки из лунок, показавших максимальный оптический сигнал, клонировали методом предельных разведений не менее 2 раз до достижения 100%-й стабильности клонов. В результате была получена панель из 11 стабильных гибридом, секретирующих МКА к rCTXB. Изотипирование полученных МКА проводили с помощью коммерческого набора тест-полосок Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche) согласно инструкции производителя.

Оценка специфичности МКА методом конкурентного ИФА

Для подтверждения способности полученных антител распознавать нативную форму CTXB проводили конкурентный ИФА. В лунки 96-луночных полистироловых планшетов (Nunc, Германия) сорбировали рекомбинантный rCTXB в концентрации 1 мкг/мл в КББ в течение ночи при 4°С. После трехкратной отмывки ФСБ свободные центры связывания блокировали 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ-Твин 20 (1 ч, 37°С).

Параллельно в отдельных пробирках готовили смесь: тестируемые МКА в концентрации 0,01 мг/мл смешивали в соотношении 1:1 по объему с культуральным бульоном *V. cholerae* 569B, содержащим нативный CTX. В качестве отрицательного контроля ингибирования использовали смесь МКА со стерильным бульоном AKI. Смесь предварительно инкубировали в течение 30 мин при 37°С, после чего переносили в лунки планшета.

После инкубации (1 ч, 37°С) и интенсивной отмывки планшета детекцию связавшихся с твердой фазой МКА проводили с помощью козьих антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена («ИМТЕК», Россия). Визуализацию ферментативной реакции проводили с использованием субстрата ТМБ. Критерием отбора служил эффект конкурентного ингибирования: специфичными к нативному антигену считались те клоны МКА, для которых наблюдалось достоверное снижение аналитического сигнала (“О” “П” _450) в присутствии бульона с нативным белком по сравнению с контрольными лунками.

Наработка, очистка и конъюгация моноклональных антител

Для наработки антител *in vivo* гибридомы культивировали в виде асцитных опухолей у мышей BALB/c, предварительно праймированных пристаном (Sigma, США). Очистку МКА из асцитной жидкости проводили методом аффинной хроматографии на колонке с Protein G-Sepharose (GE Healthcare, США). Чистоту полученных препаратов оценивали методом ДСН-ПААГ электрофореза; она составляла не менее 95%. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически.

Для проведения «сэндвич»-ИФА очищенные МКА конъюгировали с сукцинимидным эфиром биотина (Sigma, США) согласно инструкции производителя.

Отбор пар антител для «сэндвич»-ИФА. Подбор оптимальной пары антител осуществляли методом комбинаторного скрининга всех полученных МКА. Захватывающие МКА сорбировали на планшете в концентрации 2 мкг/мл в КББ в течение ночи при 4°С. После блокирования свободных центров связывания 1%-м раствором БСА в лунки вносили серийные разведения rCTXB (от 100 до 0,01 нг/мл). В качестве детектирующих антител добавляли МКА, конъюгированные с биотином. Для проявления реакции добавляли конъюгат стрептавидин-ПХ («ИМТЕК», Россия). Визуализацию проводили с использованием субстрата ТМБ.

Критерием отбора оптимальной пары служило максимальное отношение полезного сигнала к фону и наименьший предел обнаружения (LOD). По результатам анализа была отобрана пара МКА: клон CH-G9 (захватывающее антитело) и клон CH-H2 (детектирующее антитело).

Конъюгация латексных частиц с антителами

Материалы: буферный раствор 0,1 М MES-T (морфолино-2-этансульфоновая кислота с Triton X-100) (PanReac lifesciences, Испания); 10 М NaOH (Applichem, Германия); Triton X100 (Applichem, Германия); Sulfo-NHS (N-гидроксисукцинимид) (Thermo scientific, США); EDC (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил) карбодиимид) (Thermo scientific, США).

Подготовка латексных частиц. Перемешали на вортексе пробирку с частицами, отобрали 10 мкл в пробирку и добавили 500 мкл MES-T. Встряхнули в ультразвуковой ванне (Sunshine, Китай) и центрифугировали при 10 тыс. оборотов 10 мин (Eppendorf minispin, Германия). Супернатант отобрали и внесли 500 мкл свежего MES-T. Таким образом отмыли 2 раза, с осаждением на 10 тыс. оборотов 10 мин.

Активация латекса. К 500 мкл MES-T добавили ~2–3 мг EDC и столько же NHS, перемешали и добавили в отмытый латекс / тщательно ресуспендировали. Поместили в ротационный перемешиватель (Biosan Multi Bio RS–24, Латвия) на 30 мин. Отмывка латексных частиц от остатков карбодиимида. Дважды по 500 мкл MES-T на 10 тыс. оборотов 10 мин. Перед отмывкой использовали ультразвуковую ванну для устранения агрегации.

Конъюгация латексных частиц с антителами

На 10 мкл 4% суспензии латексных частиц взяли 50 мкл детектирующих антител клона CH-H2 (антител (100 мкг).

Инкубировали 2 ч в ротационном перемешивателе после осаждения в центрифуге на 10 тыс. оборотов – 10 мин. Добавили БСА (AppliChem, Германия) 0,1% от объема, инкубировали 1 ч на ротаторе. Отмыли буфером для коллоидного золота (10 Ммоль/л (pH 7,4) Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Helicon, Россия); 0,05% Tween-20 (AppliChem, Германия); 1% сахарозы («Химмед», Россия); 1% БСА; азид натрия (PanReac lifesciences, Испания)) по 500 мкл дважды.

Контроль пришивки антител

Контроль произвели на нитроцеллюлозной мембране с контрольной полосой, содержащей антивидовые антитела Goat anti Mouse IgG (0,8мг/мл) (Arista Biologicals, США). Нанесли латексные конъюгированные латексные частицы на стекловолоконную полоску и проверили с ФСБ (1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды) («Экосервис», Россия). Если латекс задерживается в контрольной зоне, то конъюгирование проведено успешно. После второй отмывки добавили буфер для коллоидного золота с 1%-м БСА 500 мкл. Нанесли оптимальное количество на стекловолокно. Конечная концентрация: в 1мл буфера для коллоидного золота должно быть 1/100 от исходной концентрации (4%) латексных частиц.

Нанесение латексных частиц на нитроцеллюлозную мембрану

Для нанесения латексных частиц на стекловолоконную мембрану PT-R5 (MDI, Индия) использовали разведение частиц в соотношении 1:1 с буфером для коллоидного золота. Далее просушивали мембрану в климатической камере (Memmert, Германия).

Изготовление лабораторных образцов ИХ-теста

После подбора пар антител был сконструирован макет ИХ-теста. Для опытно-конструкторской работы был использован ряд нитроцеллюлозных мембран производства Advanced Microdevices, Индия. При помощи диспенсера для нанесения (Iso Flow, США) были сформированы контрольная и тестовая зоны на нитроцеллюлозной мембране с размером пор 15 мкм (MDI, Индия). В контрольную зону нанесли антитела Goat anti Mouse – 0,8 мг/мл; в тестовую – полученные захватывающие МКА клона CH-G9 в концентрации 1 мг/мл. Далее подклеили стекловолоконную мембрану с латексными частицами, принимающую и впитывающую мембраны (MDI, Индия). Нарезку полотна на тесты производили гильотинным нарезчиком (Kin Bio, Китай).

Проведение иммунохроматографического анализа

В полистирольный 96-луночный планшет для ИФА поместили культуральные жидкости (КЖ) токсинпродуцирующих штаммов холерного вибриона (*V. cholerae* 569B, *V. cholerae* El Tor 1181, *V. cholerae* El Tor 1264, *V. cholerae* El Tor 1263, *V. cholerae* 131, *V. cholerae* El Tor 1310, *V. cholerae* 201, *V. cholerae* 87, *V. cholerae* El Tor 200) и гетерологичных культур (*Vibrio parahaemolyticus* 188, *Vibrio vulnificus* 157, *E. coli* 52, *Shigella dysenteriae* 63/2, *Salmonella Typhimurium* 14) в количестве 100 мкл/лунка (рис. 1 А, Б). Далее произвели последовательные разведения КЖ ФСБ с цельной КЖ до 1/1280, разводя каждую последующую пробу в 2 раза.

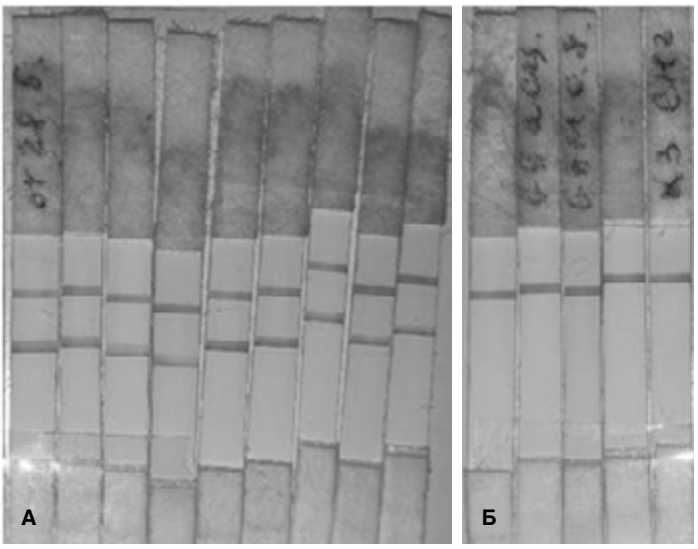


Рис. 1. **ИХ-тесты на основе наночастиц коллоидного золота. А – положительный контроль (слева направо: КЖ *V. cholerae* 569B, *V. cholerae* El Tor 1181, *V. cholerae* El Tor 1264, *V. cholerae* El Tor 1263, *V. cholerae* 131, *V. cholerae* El Tor 1310, *V. cholerae* 201, *V. cholerae* 87, *V. cholerae* El Tor 200). Б – отрицательный контроль (слева направо: КЖ *Vibrio parahaemolyticus* 188, *Vibrio vulnificus* 157, *Escherichia coli* 52, *Shigella dysenteriae* 63/2, *Salmonella* Typhimurium 14).**

Fig. 1. ***Immunochromatographic (IC) tests based on colloidal gold nanoparticles. A – positive control (from left to right: V. cholerae 569B, V. cholerae El Tor 1181, V. cholerae El Tor 1264, V. cholerae El Tor 1263, V. cholerae 131, V. cholerae El Tor 1310, V. cholerae 201, V. cholerae 87, V. cholerae El Tor 200). B – negative control (from left to right: Vibrio parahaemolyticus 188, Vibrio vulnificus 157, Escherichia coli 52, Shigella dysenteriae 63/2, Salmonella Typhimurium 14).***

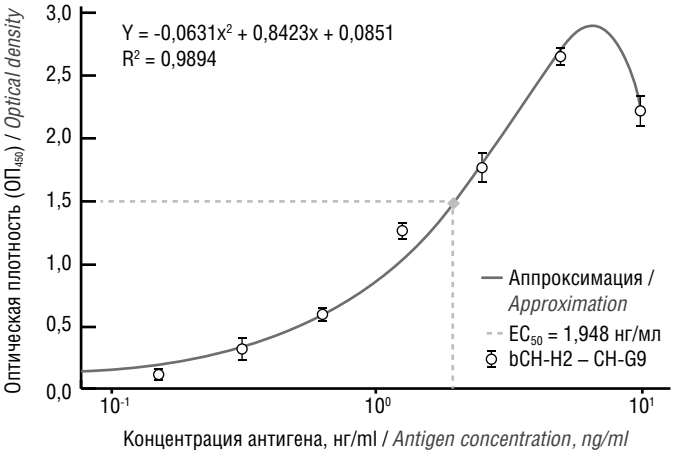


Рис. 2. **Титрование rCTXB в «сэндвич»-ИФА с МКА bCH-H2 и CH-G9.**

Fig. 2. ***Titration of rCTXB in a sandwich ELISA using mAbs bCH-H2 and CH-G9.***

Результаты сравнили с ИХ-тестами на основе коллоидного золота.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате иммунизации мышей BALB/c рекомбинантным rCTXB, последующей гибридизации иммунных спленоцитов с миеломными клетками и клонирования была получена панель стабильных гибридом, секретирующих специфические МКА. Для поиска оптимальной пары МКА провели

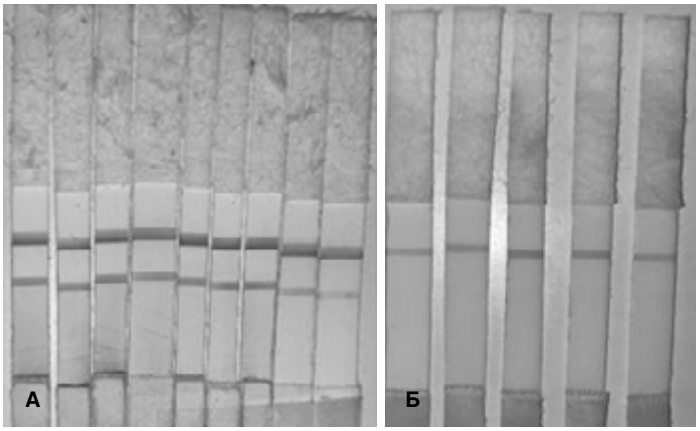


Рис. 3. **ИХ-тесты на основе латексных микросфер. А – положительный контроль (слева направо: КЖ *V. cholerae* 569B, *V. cholerae* El Tor 1181, *V. cholerae* El Tor 1264, *V. cholerae* El Tor 1263, *V. cholerae* 131, *V. cholerae* El Tor 1310, *V. cholerae* 201, *V. cholerae* 87, *V. cholerae* El Tor 200). Б – отрицательный контроль (слева направо: КЖ *Vibrio parahaemolyticus* 188, *Vibrio vulnificus* 157, *Escherichia coli* 52, *Shigella dysenteriae* 63/2, *Salmonella* Typhimurium 14).**
*Fig. 3. **IR tests based on latex microspheres: A – positive control (from left to right: QOL V. cholerae 569B, V. cholerae El Tor 1181, V. cholerae El Tor 1264, V. cholerae El Tor 1263, V. cholerae 131, V. cholerae El Tor 1310, V. cholerae 201, V. cholerae 87, V. cholerae El Tor 200). B – negative control (from left to right: QOL Vibrio parahaemolyticus 188, Vibrio vulnificus 157, Escherichia coli 52, Shigella dysenteriae 63/2, Salmonella Typhimurium 14).***

комбинаторный скрининг всех очищенных МКА. По критерию максимального отношения специфического сигнала к фону была отобрана оптимальная пара: клон CH-G9 использован в качестве иммобилизованного («захватывающего») антитела, а клон CH-H2 – в качестве детектирующего.

Тестирование в «сэндвич»-ИФА показало, что система на основе выбранных МКА характеризовалась низким уровнем неспецифического фонового связывания (оптическая плотность (ОП) нулевого стандарта составила 0,076 ± 0,018 ед.). Аппроксимация кривой титрования квадратичной полиномиальной моделью с высокой степенью достоверности (R2 = 0,9894) показала зависимость вида:

$Y = -0{,}0631x^2 + 0{,}8423x + 0{,}0851$.

Использование квадратичной функции позволило корректно описать дозозависимый отклик системы, включая эффект прозоны (хук-эффект), наблюдаемый при избытке антигена (рис. 2).

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, LOD) разрабатываемой тест-системы в формате «сэндвич»-ИФА составила 0,15 нг/мл. Концентрация полумаксимального связывания (EC50) составила 1,95 нг/мл (при $ОП_{450}$ = 1,486).

Отобранную пару МКА далее использовали для получения ИХ-тестов. По результатам ИХ-анализа бульонов бактериальных культур было установлено, что тесты на основе как наночастиц коллоидного золота, так и латексных микросфер обладают идентичной специфичностью (100%). Тест-полоски давали положительный результат (окрашивание контрольной и тестовой зон) при использовании КЖ, содержащих ХТ, и демонстрировали отсутствие сигнала (окрашивалась только контрольная зона) при анализе гетерологичных КЖ (рис. 1, 3).

Сравнительный анализ показал высокую специфичность разработанных тест-систем. При оценке чувствительности было выявлено, что тесты на основе коллоидного золота и латексных микросфер обладают сопоставимыми аналитическими характеристиками при разведении КЖ (рис. 4 А, Б). Предел обнаружения ХТ составил 12,5 ± 2,0 нг/мл (*N* = 20).

В 2021 г. исследователями был проведен систематический обзор и метаанализ исследований, в которых оценивались экспресс-тесты на холеру для выявления *V. cholerae* O1 в сравнении с культуральным исследованием кала или ПЦР. В них оценивались 8 экспресс-тестов на холеру (Crystal VC-O1, Crystal VC, Cholkit, тест-полоска для выявления холеры Института Пастера, SD Bioline, Artron, Cholera Smart O1 и Smart II Cholera O1). Исходя из литературных данных, концентрация токсина в стуле пациентов варьируются от 26 до >100 нг/мл [11]. При сопоставлении характеристик нашей разработки с коммерческим тестом CT-IC [7, 8], используемым для мониторинга токсигенных штаммов *V. cholerae*, следует отметить, что аналитические параметры полученного нами теста являются сопоставимыми.

Заключение

Поскольку холерный токсин является причиной большинства симптомов, вызываемых инфекцией *V. cholerae*, его обнаружение имеет решающее значение для диагностики заболевания. В данной работе описана ИХ-тест-система для обнаружения ХТ с использованием МКА, конъюгированных с латексными микросферами. Предел детекции составил 12,5 нг/мл, что позволяет использовать данную систему в рутинной лабораторной практике для мониторинга вспышек инфекции. Дальнейшие этапы работы будут

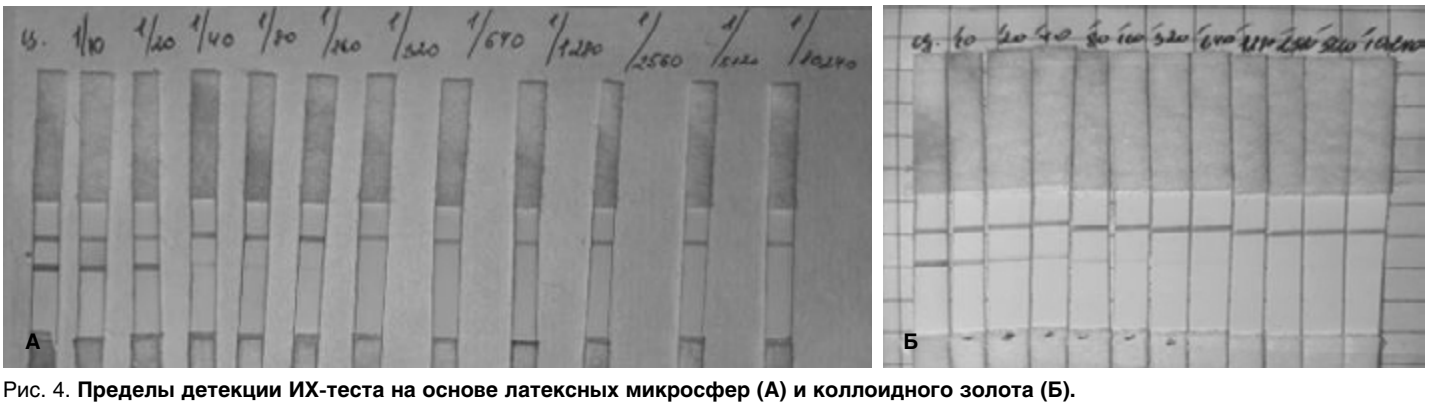


Рис. 4. **Пределы детекции ИХ-теста на основе латексных микросфер (А) и коллоидного золота (Б).**
*Fig. 4. **Detection limits of an immunochromatographic test based on latex microspheres (A) and colloidal gold (Б).***

направлены на повышение аналитической чувствительности и адаптацию теста для прямого тестирования клинических образцов.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках СЩ_3 по Госзаданию в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ.

Funding

The work was carried as part of SS_3 under a State Assignment at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology ona unique scientific facility of the SRCAMB.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. WHO. [Electronic resource]. Available at: https://www.who.int/ru/news/item/12-09-2025-cholera-kills-more-people-for-second-consecutive-year-while-revention-and-treatment-available (accessed 18.09.2026).
2. Chowdhury F, Ross AG, Islam MT, McMillan NAJ, Qadri F. Diagnosis, Management, and Future Control of Cholera. Clin Microbiol Rev. 2022 Sep 21;35(3):e0021121. DOI: 10.1128/cmr.00211-21
3. Molla AM, Rahman M, Sarker SA, Sack DA, Molla A. Stool electrolyte content and purging rates in diarrhea caused by rotavirus, enterotoxigenic *E. coli*, and *V. cholerae* in children. J Pediatr. 1981 May;98(5):835-8. DOI: 10.1016/s0022-3476(81)80863-3
4. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsushima A, Asai Y, et al. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. Curr Microbiol. 1994;28:175-178. DOI: 10.1007/BF01571061
5. Kanungo S, Azman AS, Ramamurthy T, Deen J, Dutta S. Cholera. Lancet. 2022 Apr 9;399(10333):1429-1440. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00330-0
6. World Health Organization: Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. 2003:103. [Electronic resource]. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-CSR-RMD-2003.6 (accessed 18.09.2026).
7. Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Morimatsu F, Kurazono T, Hiroi T, et al. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. Biomed Res Int. 2013;2013:679038. DOI: 10.1155/2013/679038
8. Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Maiti B, Okumura K, Morimatsu F, et al. Detection of Cholera Toxin by an Immunochromatographic Test Strip. Methods Mol Biol. 2017;1600:1-7. DOI: 10.1007/978-1-4939-6958-6_1
9. Kalluri P, Naheed A, Rahman S, Ansaruzzaman M, Faruque AS, Bird M, et al. Evaluation of three rapid diagnostic tests for cholera: does the skill level of the technician matter? Trop Med Int Health. 2006 Jan;11(1):49-55. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01539.x
10. Boum Ii Y, Fai KN, Schramm B, Corine TM, Tchiasso D, Essomba R, et al. Decentralised rapid diagnostic tests enable cholera diagnosis by non-laboratory health workers during outbreaks in Cameroon. Sci Rep. 2026 Jun 3;16(1):25215. DOI: 10.1038/s41598-026-55479-9
11. Muzembo BA, Kitahara K, Ohno A, Debnath A, Okamoto K, Miyoshi SI. Cholera Rapid Diagnostic Tests for the Detection of *Vibrio cholerae* O1: An Updated Meta-Analysis. Diagnostics (Basel). 2021 Nov 13;11(11):2095. DOI: 10.3390/diagnostics11112095

Информация о соавторах:

Баранова Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-6455-5756

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0504-7073

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

Панфёрцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Баранова Анастасия Андреевна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Волошин Александр Григорьевич, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1179-6895

Information about co-authors:

Evgenia V. Baranova, PhD, MD, Leading Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-6455-5756

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0504-7073

Vera A. Yakovleva, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Evgeny A. Panfertsev, PhD, MD, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Tat'ana V. Reshetnyak, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anastasia A. Baranova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

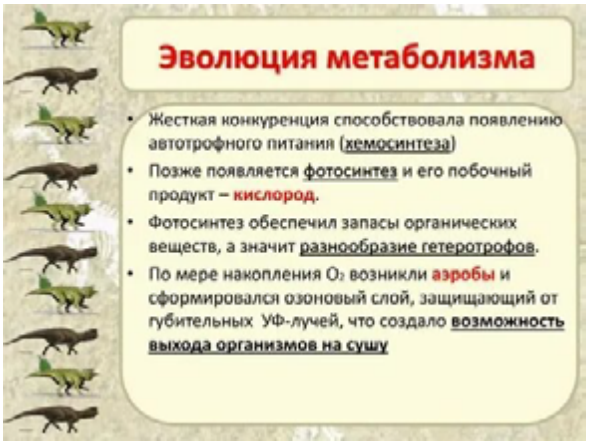
Alexander G. Voloshin, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Alexey A. Gorbatov, PhD, MD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1179-6895

НОВОСТИ НАУКИ

Ранняя эволюция метаболизма



Возникновение жизни потребовало появления метаболизма – автокаталитической сети ферментативных реакций, синтезирующих аминокислоты, нуклеотиды и кофакторы. В момент зарождения метаболизма не существовало ферментов – как же он начался? Эмпирических исследований, посвященных ранней эволюции метаболизма, не хватает. Используя структуры белков для изучения метаболических ферментов, мы идентифицируем промежуточные состояния в первоначальной сборке метаболизма. Мы показываем, что ферментативный метаболизм у универсального общего предка был неполным и завершил свою сборку независимо в линиях, ведущих к бактериям и археям. Нативные переходные металлы – железо, кобальт, никель и палладий – служили каталитическими предшественниками как ферментов, так и кофакторов в момент зарождения метаболизма, в то время как фосфит обеспечивал энергию, поскольку он фосфорилирует аденозин-5′-монофосфат до аденозина-5′-дифосфата и серин до фосфосерина с использованием нативных металлических катализаторов в воде. Фосфит и нативные металлы встречаются в серпентинизирующих гидротермальных системах, что позволяет определить место зарождения метаболизма как источник энергии и каталитический центр. Кофакторы освободили зарождающийся метаболизм от зависимости от нативных металлических катализаторов, обеспечив его автокаталитическое состояние.

Hoffmann NK, Schlikker ML, Martin WF.
Metal-catalyzed phosphorylation by phosphite and energy at origins.
Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2026 Sep 11;1868(1):149610. DOI: 10.1016/j.bbabio.2026.149610

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-75-81

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 75–81
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 75–81

Апробация тест-системы для диагностики малярии на основе метода петлевой изотермической амплификации на клиническом материале

И.Ю.Щит[1], Морис Лама[2], Мамаду Бундухура Бах[2], А.А.Болтунова[1], А.А.Горбатов[1], Мохамед Сахар Траоре[2], Е.В.Найдёнова[3], С.Ф.Бикетов[1]

[1]ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, Российская Федерация;
[2]Институт прикладных биологических исследований Гвинеи (IRBAG), Киндиа, Республика Гвинея;
[3]ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Малярия остается одной из основных причин заболеваемости и смертности в эндемических районах, среди которых страны Азии, Южной Америки и Африки. Однако во всем остальном мире ежегодно регистрируются завозные случаи. Возбудителем малярии у человека являются простейшие рода *Plasmodium*, из которых наиболее часто заболевание вызывает *Plasmodium falciparum*. В настоящее время наиболее распространенными методами диагностики малярии являются тесты на основе метода петлевой изотермической амплификации (LAMP). Целью данной работы стала разработка LAMP-теста для выявления ДНК возбудителя малярии в образцах крови. Для решения поставленной задачи были получены все необходимые составляющие тест-системы: BST-полимераза и праймеры, специфично взаимодействующие с ДНК *P. falciparum*. В результате удалось создать тест-систему, способную выявлять ДНК возбудителя малярии с высоким пределом обнаружения.
Ключевые слова: малярия, полимеразная цепная реакция, LAMP, Plasmodium falciparum, образцы крови

Для цитирования: Щит И.Ю., Лама М., Бах М.Б., Болтунова А.А., Горбатов А.А., Траоре М.С., Найдёнова Е.В., Бикетов С.Ф. Апробация тест-системы для диагностики малярии на основе метода петлевой изотермической амплификации на клиническом материале. Бактериология. 2026; 11(3): 75–81. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-75-81

Validation of a loop-mediated isothermal amplification-based test system for malaria diagnosis using clinical specimens

I.Yu.Shchit[1], Maurice Lama[2], Mamadou Boundoukhoura Bah[2], A.A.Boltunova[1], A.A.Gorbatov[1], Mamed Zaar Traoré[2], E.V.Naidenova[3], S.F.Biketov[1]

[1]State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology" of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation;
[2]Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée, Kindia, République de Guinée;
[3]Federal State Institution of Science "Russian Research Anti-Plague Institute 'Microbe'" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

Malaria remains one of the main causes of morbidity and mortality in endemic areas, including countries in Asia, South America, and Africa. However, imported cases are recorded annually in the rest of the world. The causative agents of malaria in humans are protozoa of the genus *Plasmodium*, with *Plasmodium falciparum* being the most common cause of the disease. Currently, the most common methods for diagnosing malaria are tests based on the loop-mediated isothermal amplification method. The aim of this work was to develop a LAMP test for detecting the DNA of the malaria pathogen in blood samples. To achieve this goal, all the necessary components of the test system were obtained: BST polymerase and primers that specifically interact with *P. falciparum* DNA. As a result, it was possible to create a test system capable of detecting the DNA of the malaria pathogen with a high detection limit.
Key words: malaria, polymerase chain reaction, LAMP, Plasmodium falciparum, blood samples

For citation: Shchit I.Yu., Lama M., Bah M.B., Boltunova A.A., Gorbatov A.A., Traoré M.Z., Naidenova E.V., Biketov S.F. Validation of a loop-mediated isothermal amplification-based test system for malaria diagnosis using clinical specimens Bacteriology. 2026; 11(3): 75–81. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-75-81

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0001-9871-8018

Статья поступила 15.09.2026, принята к печати 30.10.2026

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Departmen of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0001-9871-8018

The article was received 15.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

Малярия – это трансмиссивное природно-очаговое паразитарное заболевание, вызываемое простейшими рода *Plasmodium*. Проявляется болезнь в виде лихорадки, эритроцитопатии и гемолиза. Переносчик паразита – комары рода *Anopheles*. В странах тропического пояса Африки, Азии и Южной Америки малярия представляет одну из ключевых проблем общественного здравоохранения. Ежегодная заболеваемость оценивается в 300–500 млн случаев, с летальностью в 1,5–2,7 млн смертей в год [1]. Экономические и социальные издержки от этого заболевания в Африке достигают 1,8 млрд долларов ежегодно [2].

Малярия является основной причиной заболеваемости и смертности населения Гвинейской Республики. Данное заболевание занимает 1-е место по частоте обращений в медицинские учреждения, составляя от 30 до 40% от общего объема случаев, и выступает ведущим фактором летальности среди госпитализированных пациентов. Ежегодно фиксируется до 8,64 млн случаев заболевания, при этом количество смертей среди детей достигает приблизительно 60 тыс. [3]. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения и отчету о малярии за 2025 г., в 2024 г. было зарегистрировано 280 млн случаев заболевания и 0,6 млн летальных исходов [4].

Ежегодно, с началом сезона дождей, увеличивается количество комаров рода *Anopheles*, которые активно нападают на людей, и вследствии этого вырастает количество лихорадящих пациентов. Большая часть взрослого населения страны перенесли болезнь несколько раз, постепенно вырабатывая иммунитет. Но дети, чья иммунная система еще не подготовлена к борьбе с паразитами, подвергаются гораздо большему риску. По статистике, в 2005 г. примерно каждый шестой ребенок, родившийся в Гвинее, умер, не дожив до 5 лет, многие – от малярии.

Основным этиологическим агентом малярии в Гвинее является *Plasmodium falciparum*. Болезнь, вызванная другими видами плазмодия, встречается редко, и опубликованы данные лишь о единичных случаях заражения другими видами [5, 6]. Были зарегистрированы случаи заражения *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, а также смешанные инфекции, вызванные *P. falciparum* и *P. vivax*, среди путешественников [5, 7–9].

Гвинея разделена на четыре экологических региона с различным уровнем эндемичности малярии, наиболее высокая концентрация которой наблюдается в южном лесном регионе [10]. Передача инфекции происходит круглогодично (пик: июль–октябрь) преимущественно через комаров видов *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* и *Anopheles arabiensis* [11, 12].

Наибольшее бремя заболевания приходится на детей до 5 лет. В этой группе распространенность малярии превышает 40% в ряде округов (Нзерекоре, Канкан, Фаранаха), а показатели смертности достигают >12,5 случая на 1000 живорожденных [13]. К основным факторам риска относятся проживание в сельской местности или лесном регионе, наличие спленомегалии, а также отсутствие профилактических мер среди беременных женщин (неиспользование сеток и неполный курс медикаментозного лечения) [5, 14]. Заболеваемость в большинстве медицинских округов составляет от 100 до 300 случаев на 1000 жителей в год [13].

При диагностике малярию следует подозревать у любого пациента с лихорадкой во время пребывания в зоне риска или после возвращения из нее, независимо от того, принимал ли он профилактические препараты. При подозрении на малярию следует учитывать клиническую картину и эпидемиологический анамнез. Классическими проявлениями у пациента являются лихорадка, потливость и озноб, которые появляются через 10–15 дней после укуса комара.

Стандартный метод диагностики малярии включает взятие образца крови для исследования паразита под микроскопом. Если толстый мазок крови дает положительный результат, готовится тонкий мазок крови для определения вида и степени заражения паразитами.

Точная диагностика малярии играет важную роль в борьбе с заболеванием. Благодаря традиционным диагностическим методам программы борьбы с малярией достигли значительных успехов за последнее десятилетие и в настоящее время движутся к ликвидации малярии во многих регионах. Однако ситуация требует новых диагностических методов лабораторных подходов с повышенной чувствительностью, пропускной способностью и сниженной стоимостью для активного скрининга малярийных паразитов, поскольку для предотвращения передачи необходимо идентифицировать всех трансфицированных больных.

Ключевым фактором успеха в элиминации малярии является точная лабораторная диагностика. Идеальный тест должен предоставлять легко интерпретируемые результаты, обеспечивая высокую скорость, точность, специфичность и чувствительность. Эти параметры имеют решающее значение для достижения цели полного искоренения заболевания [15]. Кроме того, эффективность диагностики зависит от ее стоимости, производительности и уровня сложности [16]. Молекулярные тесты за последние два десятилетия продемонстрировали значительные достижения и, по прогнозам, станут предпочтительным методом диагностики в программах по элиминации малярии.

В настоящее время наиболее широко применяемыми молекулярными методами диагностики малярии являются тесты на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [17–21]. Они характеризуются высоким пределом обнаружения малярийной инфекции – <0,02 паразита на микролитр крови [22, 23]. ПЦР – наиболее чувствительный метод, и в настоящее время он является предпочтительным при подозрении на низкоуровневую или смешанную паразитемию. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние годы в области ПЦР, внедрение этой технологии для проведения тестов на месте оказания медицинской помощи по-прежнему затруднено, в основном из-за необходимости использовать дорогостоящее лабораторное оборудование и источники питания, а также из-за относительно длительного времени выполнения.

Методы изотермической амплификации обладают потенциалом для полевой диагностики малярийной инфекции. Они не нуждаются в дорогостоящем и энергоемком термоциклере и позволяют получать результаты за короткое время (от 30 мин до 1 ч) [24]. Для Гвинейской Республики, вся территория которой является эндемичной, где обычные коммерческие экспресс-тесты показывают недостаточную чувствительность в связи с т.н. «низкоуровневой паразите-

мией», которая широко распространена у населения из-за приема химиопрепаратов и при повторных заболеваниях, крайне необходимы тесты, позволяющие диагностировать малярию по анализу крови даже при латентной форме, когда концентрация возбудителя в крови <1000 кл./мл. Поэтому для детекции плазмодиев перспективны системы на основе изотермической амплификации ДНК (LAMP), пригодные для использования вне лаборатории в регионах с ограниченной инфраструктурой [25]. Основным препятствием для их применения является необходимость соблюдения холодовой цепи при транспортировке чувствительных реагентов, что решается путем лиофилизации компонентов реакции для обеспечения их стабильности и продления срока годности.

Целью настоящей работы явилась разработка стабильного при хранении в комнатных условиях LAMP-теста в лиофилизированном формате для детекции ДНК возбудителя малярии *P. falciparum*.

Материалы и методы

Получение Bst-полимеразы из биомассы рекомбинантного штамма *Escherichia coli*; конструирование LAMP-праймеров; составление реакционной LAMP-смеси для лиофилизации; лиофилизацию реакционной смеси LAMP-теста; проведение петлевой изотермической амплификации проводили, как описано ранее [26].

Проведение клинико-лабораторных испытаний

Работа проводилась на базе лаборатории Российско-Гвинейского Центра в ноябре 2025 г.

Для проверки эффективности набора реагентов «Malaria-LAMP dry» использовали кровь больных малярией: 24 образца цельной крови и 45 образцов крови, высушенной на фильтровальной бумаге. Образцы для исследования были собраны специалистами Института прикладной биологии Гвинеи. Наличие возбудителя малярии было подтверждено с помощью микроскопии.

ДНК из образцов крови выделяли с помощью набора реагентов «РибоПреп» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

В качестве препарата сравнения использовали набор реагентов «АмплиСенс® *Plasmodium* spp./*P.falciparum*/*P.vivax*-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Таблица 1. **Детекция возбудителя малярии *P. falciparum* в цельной крови заболевших малярией людей**
Table 1. ***Detection of the malaria pathogen P. falciparum in whole blood of people with malaria***

№ п/п / *Item No*	№ образца / *Sample No*	Результат микроскопического исследования / *Result of microscopic examination*	Результат ПЦР / *PCR Result*	Результат LAMP / *LAMP Result*
1	15	+	+	+
2	255	+	+	+
3	123	+	–	–
4	124	+	–	+
5	127	+	+	–
6	129	+	–	–
7	135	+	+	+
8	142	+	+	–
9	152	+	–	+
10	153	+	+	–
11	154	+	–	–
12	155	+	+	+
13	156	+	+	+
14	158	+	–	–
15	160	+	–	+
16	161	+	+	+
17	165	+	+	+
18	166	+	+	+
19	167	+	+	+
20	168	+	+	–
21	171	+	+	+
22	172	+	+	+
23	175	+	+	+
24	177	+	+	+
25	ОКО	НИ	–	–
26	К–	НИ	–	–
27	К+	НИ	+	НИ
28	ПКО	НИ	НИ	+

НИ – не исследовали. / *НИ – not researched.*

Результаты исследования и их обсуждение

1. Наработка экспериментальных серий LAMP-тестов «Malaria-LAMP dry» для выявления ДНК *P. falciparum* для проведения клинико-лабораторных испытаний

В ходе проведения работ сконструирована экспериментальная серия набора реагентов для выявления ДНК возбудителя малярии *P. falciparum* в крови методом LAMP «Malaria-LAMP dry» (приложение 1). В акте наработки указаны основные показатели и этапы наработки набора реагентов для выявления ДНК возбудителя малярии *P. falciparum* в крови методом LAMP «Malaria-LAMP dry». Акт содержат информацию о полном наименовании разработанного диагностического теста, назначении теста, указаны даты проведения наработки и выходного контроля, места наработки, дан перечень участников, ответственных за разработку и тестирование системы, с указанием их ролей и должностей. В акте описаны использованные в процессе наработки тест-системы методы, включая использованные реагенты и оборудование. Описаны полученные результаты, включая данные о чувствительности, специфичности, достоверности теста. Акты содержат подписи участников наработки, подтверждающие достоверность представленных данных. В актах документирован процесс наработки и тестирования диагностической тест-системы, что важно для последующей сертификации и внедрения в клиническую практику.

2. Проведение клинико-лабораторных испытаний LAMP-тестов для выявления ДНК *P. falciparum*

При получении сухого теста в качестве режима лиофилизации был выбран метод быстрого замораживания состава реакционной смеси. Это обусловлено тем, что при медлен-

Таблица 2. **Детекция возбудителя малярии *P. falciparum* в сухих пятнах крови заболевших малярией людей**
Table 2. ***Detection of the malaria pathogen P. falciparum in dried blood spots of people with malaria***

№ п/п / *Item No*	№ образца / *Sample No*	Результат микроскопического исследования / *Result of microscopic examination*	Результат ПЦР / *PCR Result*	Результат LAMP / *LAMP Result*
1	31	+	+	+
2	32	+	–	–
3	33	+	–	–
4	34	+	–	–
5	35	+	–	–
6	36	+	+	+
7	37	+	+	+
8	38	+	+	+
9	39	+	+	+
10	40	+	–	–
11	41	+	–	–
12	42	+	–	+
13	43	+	+	+
14	44	+	–	–
15	45	+	+	+
16	46	+	+	+
17	47	+	+	+
18	48	+	–	+
19	49	+	+	+
20	50	+	–	+
21	51	+	+	+
22	52	+	+	–
23	53	+	–	–
24	54	+	+	+
25	55	+	+	–
26	56	+	–	–
27	57	+	–	+
28	58	+	–	+
29	60	+	–	+
30	61	+	–	–
31	63	+	–	+
32	64	+	–	+
33	65	+	–	+
34	66	+	–	+
35	67	+	–	–
36	68	+	–	+
37	69	+	–	+
38	70	+	–	+
39	71	+	–	–
40	73	+	–	–
41	74	+	–	+
42	75	+	+	–
43	76	+	–	–
44	77	+	+	+
45	78	+	+	+
46	ОКО	НИ	–	–
47	К-	НИ	–	–
48	К+	НИ	+	НИ
49	ПКО	НИ	НИ	+

НИ – не исследовали. / *НИ – not researched.*

ном охлаждении происходит рост крупных кристаллов льда, приводящий к деструкции структуры веществ за счет механического воздействия растущих кристаллических включений. Быстрое замораживание обеспечивает формирование мелкокристаллической структуры льда, минимизирующей структурные повреждения компонентов смеси.

Лиофилизацию реакционной смеси проводили, как описано ранее [26].

Для оценки эффективности лиофилизированных тестов использовали цельную кровь от пациентов с признаками малярии. Все образцы были исследованы на наличие плазмодиев в крови методом «толстая капля», который является золотым стандартом для диагностики малярии, особенно при низком уровне паразитов в крови. Все образцы охарактеризованы как положительные.

Результаты амплификации с помощью ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени и с помощью LAMP приведены в табл. 1.

Из 24 исследованных образцов крови от заболевших малярией людей ПЦР-тест выявил 17 положительных образцов, LAMP – 16, что составило 70,8 и 66,7% соответственно. Три образца, положительных в ПЦР, не были подтверждены методом LAMP, и в этих случаях Ct составил 37,4; 39,3 и 36,9, что говорит о низкой плотности паразитов. В свою очередь, LAMP выявила три положительных образца, не подтвержденных ПЦР. Такие расхождения не являются редкостью для тестов с порогом обнаружения, сопоставимым с референтным стандартом, и аналогичные ситуации наблюдались в других исследованиях [27, 28]. Причиной могут быть либо ложноположительные результаты LAMP [27], либо деградация целевой ДНК из-за низкой концентрации [29].

Далее был проведен анализ сухих пятен крови больных малярией, нанесенных на фильтровальную бумагу и высушенных. Сухие пятна крови на бумаге являются отличным материалом для выделения ДНК, так как в высушенном виде генетический материал сохраняется очень долго. К преимуществам использования сухих пятен крови следует отнести удобство хранения и транспортировки: высохшие образцы стабильны и не требуют жесткого соблюдения «холодовой цепи» (перевозки в холодильнике). Для проведения теста требуется всего несколько капель крови. Все образцы сухих пятен крови были исследованы на наличие плазмодиев в крови методом «толстая капля» и охарактеризованы как положительные. Результаты амплификации с помощью ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени и с помощью LAMP приведены в табл. 2.

Из 45 исследованных образцов ДНК, выделенных из сухих пятен крови заболевших малярией людей, ПЦР-тест

выявил 17 положительных образцов, LAMP-анализ – 28, что составило 37,8 и 62,2% соответственно. LAMP выявила образцы, не подтвержденные ПЦР. Вероятно, это связано с низкой плотности паразитов в крови или деградацией целевой ДНК. В целом результаты, полученные с помощью набора реагентов «Malaria-LAMP dry», были сопоставимы с результатами, полученными с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Plasmodium* spp./*P.falciparum*/*P.vivax*-FL».

Полученные результаты показали, что LAMP – простой и удобный метод для полевых условий, не требующий лабораторных помещений. Таким образом, он представляет собой перспективную альтернативу молекулярной диагностике малярии на месте оказания медицинской помощи. Однако, поскольку LAMP все же не выявила часть инфекций с низкой плотностью паразитов, а стоимость коммерческих наборов остается относительно высокой, требуется дальнейшее усовершенствование метода для полноценной замены ПЦР, особенно в программах по элиминации малярии.

Лиофилизированный формат LAMP-тестов обеспечивает стабильность реагентов при 20–30°C без потери чувствительности, упрощает процедуру анализа и исключает необходимость холодовой цепи. Время диагностики составляет 30–60 мин; регистрация результата возможна с помощью трансиллюминатора или УФ/LED-фонарика.

Разработан готовый к применению LAMP-тест для экспресс-диагностики малярии, обладающий высокой стабильностью при низких температурах (до 30 суток) и комнатной температуре (от 10 суток). Метод основан на изотермической амплификации ДНК после растворения реагентов в стерильной воде. Использование высушенного формата минимизирует риск контаминации, исключая многократное пипетирование и циклы замораживания-размораживания.

Данная тест-система прошла предварительные испытания на клинических образцах крови пациентов с малярией. Для валидации диагностической эффективности необходимы исследования на расширенной выборке, а также определение сроков стабильности реагентов при различных температурных режимах хранения.

Заключение

На основе полученных результатов по разработке, после проведения необходимых испытаний, будут внедрены на производство и подготовлены к регистрации диагностические тест-системы, выявляющие специфическую ДНК *P. falciparum* с помощью реакции изотермической амплификации и не требующие минусовых температур при хранении и транспортировке.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках СЩ_1 по Госзаданию в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ.

Funding

The work was carried as part of SS_1 under a State Assignment at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology ona unique scientific facility of the SRCAMB.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000 Apr;94 Suppl 1:S1-90.
2. Siala E, Ben Abdallah R, Bouratbine A, Aoun K. Actualités du diagnostic biologique du paludisme: current biological diagnosis of malaria. Revue Tunisienne d'Infectiologie. 2010;4:5-9.
3. Буаро МИ, Бумбали С, Константинов ОК, Каливоги С, Кулибали М, Ба АС. Показатели иммунитета у больных тропической малярией в Гвинейской Республике. Инфекция и иммунитет. 2016;6(2):151-156. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-2-151-156
4. World malaria report 2025: addressing the threat of antimalarial drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2025. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. Beavogui AH, Delamou A, Camara BS, Camara D, Kourouma K, Camara R, et al. Prevalence of malaria and factors associated with infection in children aged 6 months to 9 years in Guinea: results from a national cross-sectional study. Parasite Epidemiol Control. 2020;11:e00162. DOI: 10.1016/j.parepi.2020.e00162
6. Turaman C, Basco LK, Le Bras J. Evaluating the efficacy of chloroquine in febrile Guinean children infected with *Plasmodium falciparum* by a simplified in vivo test. Bull World Health Organ. 1992;70(4):477-80.
7. Alfandari S, Santré C, Chidiac C, Senneville E, Leroy O, Beuscart C, et al. Imported malaria: presentation and outcome of 111 cases. Clin Microbiol Infect. 1996;2:86-90. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1996.tb00211.x

8. Carlsson T, Bergqvist L, Hellgren U. Homeopathic resistant malaria. J Travel Med. 1996;3:62. DOI: 10.1111/j.1708-8305.1996.tb00700.x
9. Wickramage K, Galappaththy GNL. Malaria burden in irregular migrants returning to Sri Lanka from human smuggling operations in West Africa and implications for a country reaching malaria elimination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2013;107:337-340. DOI: 10.1093/trstmh/trt009
10. Carnevale P, Toto JC, Guibert P, Keita M, Manguin S. Entomological survey and report of a knockdown resistance mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* from the Republic of Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:484-489. DOI: 10.1016/j.trstmh.2010.02.002
11. International Association for Medical Assistance to Travelers. Guinea General Health Risks: Malaria [Electronic resource]. 2020 [accessed 2020 Dec 13]. Available at: https://www.iamat.org/country/guinea/risk/malaria#
12. Bosman A, Modiano D, Voglino MC, Pizzi L, Bartoloni P, Kandia Diallo I, et al. Malaria transmission in a central area of Futa Djalon (Guinea): results of a parasitological survey during the 1989 rainy season. Parassitologia. 1992 Dec;34(1-3):135-42.
13. High Malaria Incidence in Guinea: Malaria [Electronic resource]. 2025 [accessed 2025 Feb 26]. Available at: https://atlasvisualdelamalaria.org/en/high-malaria-incidence-in-guinea
14. Touré AA, Doumbouya A, Diallo A, Loua G, Cissé A, Sidibé S, et al. Malaria-associated factors among pregnant women in Guinea. J Trop Med. 2019;2019:3925094. DOI: 10.1155/2019/3925094
15. Boncy PJ, Adrien P, Lemoine JF, Existe A, Henry PJ, Raccurt C, et al. Malaria elimination in Haiti by the year 2020: an achievable goal? Malar J. 2015 Jun 5;14:237. DOI: 10.1186/s12936-015-0753-9
16. Cordray MS, Richards-Kortum RR. Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. Am J Trop Med Hyg. 2012 Aug;87(2):223-230. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0685
17. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5636-43. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004
18. Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, Weil GJ. A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009 Apr;103(4):365-70. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.07.012
19. Dormond L, Jaton-Ogay K, de Vallière S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. Clin Microbiol Infect. 2011 Mar;17(3):469-75. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03218.x
20. Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. Malar J. 2011 Aug 19;10:244. DOI: 10.1186/1475-2875-10-244
21. Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. Am J Trop Med Hyg. 2012 Mar;86(3):383-94. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.10-0658
22. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NP, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. J Clin Microbiol. 2014 Sep;52(9):3303-9. DOI: 10.1128/JCM.01057-14
23. Cheng Z, Wang D, Tian X, Sun Y, Sun X, Xiao N, et al. Capture and Ligation Probe-PCR (CLIP-PCR) for Molecular Screening, with Application to Active Malaria Surveillance for Elimination. Clin Chem. 2015 Jun;61(6):821-8. DOI: 10.1373/clinchem.2014.237115
24. Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. J Antimicrob Chemother. 2015 Jan;70(1):2-13. DOI: 10.1093/jac/dku343
25. Блынская ЕВ, Тишков СВ, Алексеев КВ, Минаев СВ, Марахова АИ. Применение полиэтиленгликоля в технологии лиофилизации для приготовления раствора для инъекций на основе субстанции ГК-2. Фармация. 2018;67(6):24-29. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-05
26. Щит ИЮ, Панферцев ЕА, Решетняк ТВ, Фёдоров ТВ, Бикетов СФ. Разработка лиофильно высушенной тест-системы на основе изотермической амплификации (LAMP) для диагностики малярии. Бактериология, 2025;10(4):10-15. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-10-15
27. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. J Infect Dis. 2013 Aug 15;208(4):637-44. DOI: 10.1093/infdis/jit183
28. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malar J. 2015 Jan 28;14:43. DOI: 10.1186/s12936-015-0573-y
29. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Juma DW, Blackstone GM, Marion WR, et al. Sample-ready multiplex qPCR assay for detection of malaria. Malar J. 2014 Apr 25;13:158. DOI: 10.1186/1475-2875-13-158

References

1. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000 Apr;94 Suppl 1:S1-90.
2. Siala E, Ben Abdallah R, Bouratbine A, Aoun K. Actualités du diagnostic biologique du paludisme: current biological diagnosis of malaria. Revue Tunisienne d'Infectiologie. 2010;4:5-9.
3. Boiro MY, Boumbali S, Konstantinov OK, Kalivogui S, Koulibali M, Bah AC. Indices of immune response in patients of falciparum malaria in Republic of Guinea. Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet). 2016;6(2):151-156. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-2-151-156 (In Russian).
4. World malaria report 2025: addressing the threat of antimalarial drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2025. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. Beavogui AH, Delamou A, Camara BS, Camara D, Kourouma K, Camara R, et al. Prevalence of malaria and factors associated with infection in children aged 6 months to 9 years in Guinea: results from a national cross-sectional study. Parasite Epidemiol Control. 2020;11:e00162. DOI: 10.1016/j.parepi.2020.e00162
6. Turaman C, Basco LK, Le Bras J. Evaluating the efficacy of chloroquine in febrile Guinean children infected with *Plasmodium falciparum* by a simplified in vivo test. Bull World Health Organ. 1992;70(4):477-80.
7. Alfandari S, Santré C, Chidiac C, Senneville E, Leroy O, Beuscart C, et al. Imported malaria: presentation and outcome of 111 cases. Clin Microbiol Infect. 1996;2:86-90. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1996.tb00211.x
8. Carlsson T, Bergqvist L, Hellgren U. Homeopathic resistant malaria. J Travel Med. 1996;3:62. DOI: 10.1111/j.1708-8305.1996.tb00700.x
9. Wickramage K, Galappaththy GNL. Malaria burden in irregular migrants returning to Sri Lanka from human smuggling operations in West Africa and implications for a country reaching malaria elimination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2013;107:337-340. DOI: 10.1093/trstmh/trt009
10. Carnevale P, Toto JC, Guibert P, Keita M, Manguin S. Entomological survey and report of a knockdown resistance mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* from the Republic of Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:484-489. DOI: 10.1016/j.trstmh.2010.02.002
11. International Association for Medical Assistance to Travelers. Guinea General Health Risks: Malaria [Electronic resource]. 2020 [accessed 2020 Dec 13]. Available at: https://www.iamat.org/country/guinea/risk/malaria#
12. Bosman A, Modiano D, Voglino MC, Pizzi L, Bartoloni P, Kandia Diallo I, et al. Malaria transmission in a central area of Futa Djalon (Guinea): results of a parasitological survey during the 1989 rainy season. Parassitologia. 1992 Dec;34(1-3):135-42.

13. High Malaria Incidence in Guinea: Malaria [Electronic resource]. 2025 [accessed 2025 Feb 26]. Available at: https://atlasvisualdelamalaria.org/en/high-malaria-incidence-in-guinea
14. Touré AA, Doumbouya A, Diallo A, Loua G, Cissé A, Sidibé S, et al. Malaria-associated factors among pregnant women in Guinea. J Trop Med. 2019;2019:3925094. DOI: 10.1155/2019/3925094
15. Boncy PJ, Adrien P, Lemoine JF, Existe A, Henry PJ, Raccurt C, et al. Malaria elimination in Haiti by the year 2020: an achievable goal? Malar J. 2015 Jun 5;14:237. DOI: 10.1186/s12936-015-0753-9
16. Cordray MS, Richards-Kortum RR. Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. Am J Trop Med Hyg. 2012 Aug;87(2):223-230. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0685
17. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5636-43. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004
18. Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, Weil GJ. A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009 Apr;103(4):365-70. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.07.012
19. Dormond L, Jaton-Ogay K, de Vallière S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. Clin Microbiol Infect. 2011 Mar;17(3):469-75. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03218.x
20. Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. Malar J. 2011 Aug 19;10:244. DOI: 10.1186/1475-2875-10-244
21. Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. Am J Trop Med Hyg. 2012 Mar;86(3):383-94. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.10-0658
22. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NP, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. J Clin Microbiol. 2014 Sep;52(9):3303-9. DOI: 10.1128/JCM.01057-14
23. Cheng Z, Wang D, Tian X, Sun Y, Sun X, Xiao N, et al. Capture and Ligation Probe-PCR (CLIP-PCR) for Molecular Screening, with Application to Active Malaria Surveillance for Elimination. Clin Chem. 2015 Jun;61(6):821-8. DOI: 10.1373/clinchem.2014.237115
24. Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. J Antimicrob Chemother. 2015 Jan;70(1):2-13. DOI: 10.1093/jac/dku343
25. Blynskaya EV, Tishkov SV, Alekseev KV, Minaev SV, Marakhova AI. Use of polyethylene glycol in freeze-drying technology for preparation of a GC-2-based solution for injection. Farmatsiya (Pharmacy). 2018;67(6):24-29. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-05 (In Russian).
26. Shchit IYu, Panfertsev EA, Reshetnyak TV, Fedorov TV, Biketov SF. Development of a freeze-dried isothermal amplification (LAMP) assay for malaria diagnostics. Bacteriology. 2025;10(4):10-15. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-10-15 (In Russian).
27. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. J Infect Dis. 2013 Aug 15;208(4):637-44. DOI: 10.1093/infdis/jit183
28. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malar J. 2015 Jan 28;14:43. DOI: 10.1186/s12936-015-0573-y
29. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Juma DW, Blackstone GM, Marion WR, et al. Sample-ready multiplex qPCR assay for detection of malaria. Malar J. 2014 Apr 25;13:158. DOI: 10.1186/1475-2875-13-158

Информация о соавторах:

Лама Морис, научный сотрудник Института прикладных биологических исследований Гвинеи

Бах Мамаду Бундухура, старший научный сотрудник, Институт прикладных биологических исследований Гвинеи
ORCID: 0000-0002-4565-269X

Болтунова Анастасия Антоновна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Траоре Мохамед Сахар, профессор, генеральный директор, Институт прикладных биологических исследований Гвинеи
ORCID: 0009-0008-9013-3347

Найдёнова Екатерина Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»
ORCID:0000-0001-6474-3696

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1179-6895

Information about co-authors:

Maurice Lama, Researcher, Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée

Mamadou B. Bah, Senior Researcher at Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée, Kindia, République de Guinée
ORCID: 0000-0002-4565-269X

Anastasia A. Boltunova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Alexey A. Gorbatov, PhD, MD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Mamed Zaar Traoré, Professor, General Director at Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée, Kindia, République de Guinée
ORCID: 0009-0008-9013-3347

Ekaterina V. Naidenova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher at Russian Research Anti-Plague Institute Microbe
ORCID:0000-0001-6474-3696

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1179-6895

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 82–88
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 82–88

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-82-88

Контактно-сорбционное обезвоживание при подготовке культур бактериальных клеток к консервации

А.Н.Сомов, И.А.Дунайцев, Н.А.Шишкова, М.В.Клыкова, В.П.Левчук, Н.Ю.Буданова, И.А.Чукина, М.В.Храмов

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

В рамках разработки эффективного метода ускоренно-полевой консервации микроорганизмов было изучено контактно-сорбционное обезвоживание (КСО) ряда грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Почти все изученные в работе грамположительные бактерии хорошо переносят высушивание силикагелями марок КСМГ (крупные гранулы) и АСКГ (мелкие гранулы) независимо от начальной температуры сорбента. Концентрация живых клеток в таких препаратах, представляющих собой смесь сорбента влаги и суспензии бактериальных клеток в защитной среде, варьировала от 25 до 90% и не изменялась до 2 нед. с момента приготовления. Это делает возможным удобную доставку отобранных образцов в стационарную лабораторию для дальнейшего изучения. Исследованные грамотрицательные виды бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* были менее устойчивы к КСО, однако и эти культуры сохраняли приемлемое количество живых клеток в течение 1-й недели после смешивания с сорбентом влаги при использовании охлажденного силикагеля КСМГ. Исключение составляли ацинетобактерии, у которых доля живых клеток падала до десятых долей процента и менее. Очевидно, что для подобных чувствительных штаммов потребуется разработка особых режимов КСО для эффективной и щадящей консервации.

Ключевые слова: бактерии, контактно-сорбционное обезвоживание, ускоренно-полевая консервация, стрессоустойчивость, выживаемость, сорбент влаги

Для цитирования: Сомов А.Н., Дунайцев И.А., Шишкова Н.А., Клыкова М.В., Левчук В.П., Буданова Н.Ю., Чукина И.А., Храмов М.В. Контактно-сорбционное обезвоживание при подготовке культур бактериальных клеток к консервации. Бактериология. 2026; 11(3): 82–88. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-82-88

Contact-sorption dehydration in the preparation of bacterial cell cultures for preservation

A.N.Somov, I.A.Dunaytsev, N.A.Shishkova, M.V.Klykova, V.P.Levchuk, N.Yu.Budanova, I.A.Chukina, M.V.Khramov

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

As part of the development of an efficient method for the rapid, field-based preservation of microorganisms, contact-sorption dehydration (CSD) was investigated using a range of Gram-positive and Gram-negative microorganisms. Nearly all the Gram-positive bacteria studied tolerate dehydration well when exposed to silica gels – specifically, the KSMG (large-granule) and ASKG (small-granule) varieties–regardless of the initial temperature of the sorbent. In these preparations, which consist of a mixture of a moisture-absorbing sorbent and a suspension of bacterial cells in a protective medium, the concentration of viable cells ranged from 25 to 90% and remained stable for up to two weeks following preparation. This facilitates the convenient transport of collected samples to a stationary laboratory for further analysis. The Gram-negative bacterial species examined – *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* – proved less resistant to CSD; however, these cultures still retained an acceptable number of viable cells during the first week after being mixed with the moisture-absorbing sorbent, provided that chilled KSMG silica gel was used. An exception was observed with Acinetobacter species, for which the proportion of viable cells dropped to a fraction of a percent or less. Clearly, for such sensitive strains, it will be necessary to develop specialized CSD protocols to ensure effective and gentle preservation.

Key words: bacteria, dehydration by contact sorption, enhanced field preservation, stress resistance, survival, moisture sorbent

For citation: Somov A.N., Dunaytsev I.A., Shishkova N.A., Klykova M.V., Levchuk V.P., Budanova N.Yu., Chukina I.A., Khramov M.V. Contact-sorption dehydration in the preparation of bacterial cell cultures for preservation. Bacteriology. 2026; 11(3): 82–88. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-82-88

Для корреспонденции:

Сомов Алексей Николаевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник 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
E-mail: somov@obolensk.org
ORCID: 0000-0001-8459-0498

Статья поступила 10.08.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Alexey N. Somov, PhD in physics and mathematics, Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
E-mail: somov@obolensk.org
ORCID: 0000-0001-8459-0498

The article was received 10.08.2026, accepted for publication 30.09.2026

Использование метода контактно-сорбционного высушивания для консервации микроорганизмов (МО) путем введения в состояние анабиоза имеет сравнительно небогатую историю применения [1, 2], в основном для сохранения МО в составе музейных коллекций [3–5] либо получения специфических препаратов [6–8]. Предполагаемое использование метода контактно-сорбционного обезвоживания (КСО) для адекватного отбора проб в полевых условиях выдвигает к нему более жесткие требования. A priori понятно, что должен применяться сорбент биологически инертный, не способный (в стандартных условиях использования) влиять на состояние популяции бактериальных клеток, т.е. вызывать отбор клеток по каким-либо другим признакам, кроме ксерорезистентности. Отбор по этому признаку, очевидно, также должен быть по возможности минимизирован. Под инертностью нужно понимать и низкую адгезию сорбента к биомассе, поскольку, например, для патогенов их вирулентность может быть сопряжена с адгезивной способностью. Высокая механическая прочность сорбента будет являться его преимуществом, поскольку полное отделение высушенной биомассы от сорбента для ее последующего анализа – необходимый этап в процессе разработки. Что касается основной рабочей характеристики сорбента – его влагоемкости, – то желательно иметь в арсенале сорбенты как с высокой влагоемкостью, так и с невысокой, по причине невозможности a priori определить влияние скорости потери влаги биомассой на выживаемость и способность к восстановлению после анабиоза. Это, возможно, позволит так организовать процесс КСО, что выживаемость будет максимально возможной при минимальном отборе по ксерорезистентности. Вышеперечисленными свойствами в разной мере обладают силикагели, цеолиты и ионообменные смолы (катиониты).

Хорошо известно, что МО могут очень сильно различаться между собой по термо- и ксерочувствительности, и это неизбежно должно сказаться на их выживании при КСО, где наряду с отбором влаги у биомассы идет потенциально опасный ее разогрев [9–11]. Поэтому для адекватной оценки возможностей КСО при ускоренно-полевой консервации бактерий необходимо изучить реакцию представителей разных групп МО по величине и механизмам устойчивости к упомянутым стрессовым факторам. Не менее важна при выборе МО для исследования практическая значимость мониторинга определенных видов бактерий, например, патогенность и распространенность в окружающей среде и среди нозокомиальных агентов. Также необходимо иметь в виду, что стрессоустойчивость варьирует в зависимости от вида/штамма МО и от физиологического состояния бактерий [11, 12]. На основании вышеизложенного были выбраны виды бактерий для исследования, удовлетворяющие таким требованиям.

Для мониторинга поверхностей, проверки и общих микробиологических исследований выбор МО часто сосредоточен на штаммах, имитирующих загрязнение окружающей среды: среди грамположительных бактерий, высокоустойчивых и типичных для микрофлоры кожи человека или чистых помещений, это *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus subtilis* (часто в споровой форме), среди грамотрицательных – *Acinetobacter* и *Escherichia coli*. Большое клиническое значение имеют другие бактерии кишечной группы, такие как энтерококки.

Ацинетобактерии (*Acinetobacter*) – широко распространенные грамотрицательные бактерии, которые встречаются практически повсеместно: естественным образом обитают в почве, пресной и морской воде, на растениях, а также на кожных покровах и слизистых оболочках животных и человека. Способность выживать в условиях обезвоженности позволила дать ацинетобактериям образное название «верблюды среди прокариотов». *Acinetobacter baumannii* стали серьезной проблемой современной медицины, т.к. в больницах они могут вызывать тяжелые нозокомиальные (внутрибольничные) инфекции, включая пневмонию, поражения мочевыводящих путей и сепсис [13].

Klebsiella pneumoniae является одним из значимых представителей семейства *Enterobacterales*, как и *E. coli*. Они широко распространены как в лечебных учреждениях, так и среди населения: благодаря капсуле устойчивы во внешней среде, длительное время могут сохраняться в почве, воде, на предметах обихода, овощах, фруктах, на коже, слизистых оболочках и в фекалиях человека и животных. Проникая из кишечника в другие ткани организма, могут вызывать тяжелые инфекционные процессы: сепсис, менингит, остеомиелит, абсцесс органов, инфицирование хирургических ран, септические артриты [14].

S. aureus – это преимущественно антропонозный микроорганизм. Главным резервуаром и источником являются люди и животные (носители или больные). В объектах внешней среды он не размножается, а лишь временно сохраняется, попадая с чешуйками кожи и выделениями зараженных людей и животных [15].

Таким образом, целью настоящей работы явилось экспериментальное обоснование контактно-сорбционного обезвоживания в качестве ускоренно-полевого метода консервации микроорганизмов на примере видов и штаммов микроорганизмов, различных по морфологии, физиологии, генетическим характеристикам, патогенности, стратегии выживания в среде обитания.

Материалы и методы

В работе использовали виды и штаммы бактерий из коллекции «ГКПМ-Оболенск»: *A. baumannii* ATCC 15308, *B. subtilis* Lhv-144, *B. subtilis* 534, *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* K12, *Enterococcus faecium* 760, *E. faecium* JDC 86, *K. pneumoniae* ATCC 12675, *K. pneumoniae* 9, *S. aureus* N2.

Применяли стандартные микробиологические методы культивирования МО и анализа содержания живых клеток в биомассе способом посева на плотные питательные среды. Вегетативную культуру *B. subtilis* выращивали посевом на агар с гидролизатом рыбной муки (ГРМ-агар, производство ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и культивированием при 28°С в течение 24 ч. Для культивирования ацинетобактера использовали ГРМ-агар с добавлением триметоприма, выращивали при температуре 37°С 48 ч. Стафилококк выращивали также на ГРМ-агаре при температуре 37°С 1 сутки.

В качестве сорбента влаги использовали силикагель (двуокись кремния) двух видов, КСМГ и АСКГ, различных по размеру гранул и влагоемкости. КСМГ (крупный силикагель

мелкопористый гранулированный, I сорт) имеет следующие характеристики: 2,8–7,0 мм (не менее 94%), насыпная плотность 720 г/л, влагоемкость 9,0 (при относительной влажности ОВ 20%), 16,0 (при ОВ 40%), 25,0 (при ОВ 60%). Силикагель АСКГ (активированный силикагель крупнопористый гранулированный) имеет следующие характеристики: 0,2–0,5 мм (не менее 94,5%), насыпная плотность 400 г/л, влагоемкость 70,0% (100% ОВ). Силикагель готовили к применению, высушивая до постоянного веса при температуре +150 ± 5°С в течение 6–8 ч. Стерильность сорбентов контролировали посевом на плотную питательную среду (ГРМ-агар). При необходимости расфасованный по 5 см^3 в пластиковые пробирки емкостью 15 либо 50 см^3 с герметично завинчивающейся крышкой сорбент выдерживали при температуре -18 ± 2°С, +4 ± 2°С либо при комнатной температуре от 3 до 24 ч и более.

Для максимального сохранения живых бактериальных клеток при КСО использовали разработанную ранее криозащитную среду состава: полиглюкин 2,0 масс.%, лактоза 6,0 масс.%, натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,1 масс.%, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,02 масс.%, вода деионизованная, pH 7,2 ± 0,2. Раствор стерилизовали автоклавированием.

Для определения количества живых бактериальных клеток в биомассе использовали суспензии клеток (до смешивания с сорбентом) и смывы с сорбента, для чего в пробирку со смесью сорбент/биомасса вносили 10 см^3 стерильного физиологического раствора комнатной температуры, перемешивали 30 мин на ротационном смесителе «Таглер РС-мульти» («Таглер», Россия) по программе, включающей переворачивание, качание и встряхивание с многократным повторением цикла. Для определения количества живых клеток отбирали 0,1 см^3 надосадочной жидкости и высевали на плотную питательную среду, используя десятикратные разведения в физиологическом растворе, с последующим подсчетом колоний.

Чтобы оценить влияние размера частиц сорбента на выживаемость бактериальных клеток при КСО, использовали силикагели со средним размером гранул, различающимся на один порядок величины, в прямом сравнительном опыте в одинаковых условиях.

Для оценки влияния продолжительности контакта с сорбентом влаги на выживаемость использовали образцы со временем выдержки от 1 до 25 суток и более. Количественно оценивали разницу в динамике снижения доли живых клеток, рассчитывая линейный коэффициент временных потерь (кинетический коэффициент) Kt по формуле:

Kt = B1 / B7,

где B1 – количество живых клеток в процентах от исходного (до смешивания с сорбентом влаги), B7 – такая же величина после 6–8 суток выдержки в контакте с сорбентом влаги.

Для оценки влияния начальной температуры сорбента влаги на выживаемость клеток при КСО выдержанный при определенной температуры сорбент смешивали с биомассой, как описано выше, и сравнивали процент выживших клеток после суток выдержки с сорбентом, рассчитывая линейный температурный коэффициент потерь Kc по формуле:

Kc = B1 (-18°C) / B1 (25°C),

где B1 (-18°C) и B1 (25°C) – процент выживших клеток после первых суток выдержки для сорбента с начальной температурой -18°C и 25°C соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с применением стандартных процедур математической статистики.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами были исследованы на выживаемость в процессе КСО по 5 бактериальных культур различных видов и штаммов, как грамотрицательных, так и грамположительных. Все культуры получали выращиванием на плотных питательных средах как описано в разделе «Материалы и методы исследования». После смыва с чашек Петри и разведения физиологическим раствором до концентрации 0,1–3·10^9 КОЕ/см^3, полученную суспензию смешивали с криозащитной средой (раздел «Материалы и методы исследования») в соотношении 1:4 по объему. Полученную суспензию клеток в защитной среде в количестве 1 см^3 вносили в пластиковую пробирку емкостью 15 либо 50 см^3, содержащую 5 см^3 сухого сорбента влаги (силикагель марки КСМГ либо АСКГ), предварительно выдержанного при температурах -18°C, +4°C или комнатной температуре (25 ± 2°C). Пробирку герметично закрывали крышкой и перемешивали содержимое 30 мин, как описано в разделе «Материалы и методы исследова-

Таблица 1. **Выживаемость грамотрицательных бактерий при КСО силикагелем марки КСМГ**
*Table 1. **Survival of Gram-negative bacteria during contact-sorption treatment with KSMG-grade silica gel***

№	Вид и штамм МО / *Microorganism species and strain*	Выживаемость при температуре сорбента, % / *Survival rate at sorbent temperature, %*						Линейный коэффициент потерь / *Linear loss coefficient*	
		-18°C		+4°C		+25°C			
		1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	Kt	Kc
1	*A. baumannii* ATCC 15308	1,3	0,3	2,8	0,01	1,9	0,02	136	0,68
2	*E. coli* BL21 DE3	34	1,5	9,9	0,3	8,1	0,1	45	4,2
3	*E. coli* K12	13	1,4	10	1,2	7,5	0,6	1,6	1,7
4	*K. pneumoniae* ATCC 12675	40	27	54	3,8	25	40	7,8	1,6
5	*K. pneumoniae* 9	80	2,6	50	4,8	39	5,7	16	2,0

Приведена величина Kt, усредненная для разных начальных температур сорбента. / *The value Kt is presented as an average across different initial temperatures of the sorbent.*

Таблица 2. **Выживаемость грамположительных бактерий при КСО силикагелем марки КСМГ**
Table 2. ***Survival of Gram-positive bacteria during contact-sorption treatment with KSMG-grade silica gel***

№	Вид и штамм МО / *Microorganism species and strain*	Выживаемость при температуре сорбента, % / *Survival rate at sorbent temperature, %*						Линейный коэффициент потерь / *Linear loss coefficient*	
		-18°C		+4°C		+25°C			
		1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	Kt	Kc
1	*B. subtilis* Lhv144	45	45	45	39	44	56	1,0	1,0
2	*B. subtilis* 534	59	30	35	27	70	14	2,8	0,84
3	*E. faecium* 760	61	74	47	62	81	51	0,7	0,75
4	*E. faecium* JDC 86	30	21	34	26	48	23	1,6	0,63
5	*S. aureus* N2	69	13	27	17	16	14	2,5	4,3

Таблица 3. **Выживаемость грамотрицательных бактерий при КСО силикагелем марки АСКГ**
Table 3. ***Survival of Gram-negative bacteria during contact with ASK-G grade silica gel***

№	Вид и штамм МО / *Microorganism species and strain*	Выживаемость при температуре сорбента, % / *Survival rate at sorbent temperature, %*						Линейный коэффициент потерь / *Linear loss coefficient*	
		-18°C		+4°C		+25°C			
		1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	Kt	Kc
1	*Ac. baumannii* ATCC 15308	0,7	0,02	4,7	0,001	20	0,24	1700	0,035
2	*E. coli* BL21 DE3	0,1	0,001	0,3	0,001	0,03	0,001	143	3,3
3	*E. coli* K12	5,6	0,005	2,4	0,001	2,2	0,001	1970	2,5
4	*K. pneumoniae* ATCC 12675	50	9	12	30	43	5,7	4,5	1,16
5	*K. pneumoniae* 9	30	0,001	3	0,001	0,02	0,001	11000	1500

Таблица 4. **Выживаемость грамположительных бактерий при КСО силикагелем марки АСКГ**
Table 4. ***Survival of gram-positive bacteria during CSO with ASKG silica gel***

№	Вид и штамм МО / *Microorganism species and strain*	Выживаемость при температуре сорбента, % / *Survival rate at sorbent temperature, %*						Линейный коэффициент потерь / *Linear loss coefficient*	
		-18°C		+4°C		+25°C			
		1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	1 сутки / *1 day*	6–8 суток / *6–8 days*	Kt	Kc
1	*B. subtilis* Lhv144	49	57	37	58	36	57	0,7	1,36
2	*B. subtilis* 534	62	81	51	86	21	89	0,53	3,0
3	*E. faecium* 760	52	63	12	30	28	47	0,6	1,86
4	*E. faecium* JDC 86	9	13	9	2	7	3	2,5	1,29
5	*S. aureus* N2	Н.о.	2	14	9	28	2	7,5	3,3

ния», для равномерного распределения биоматериала по поверхности сорбента. Смесь биоматериала с сорбентом влаги оставляли при комнатной температуре на срок от 1 до 14–15 суток, вручную встряхивая 1–3 раза в день. Анализ содержания живых клеток проводили, как описано выше, после 1–2, 3, 6–8 и 12–15 суток выдерживания при комнатной температуре (в некоторых случаях наблюдение продолжали до 21–25 суток). Результаты исследования представлены в табл. 1–4, где приведены значения доли живых клеток в процентах от их исходного значения. Каждое значение является усредненным по 2–6 опытам.

Как можно видеть из представленных данных, грамотрицательные бактерии существенно более чувствительны к стрессовым факторам КСО (потеря влаги, нагрев, осмотический шок): снижение количества живых клеток, в зависимости от начальной температуры сорбента, может достигать нескольких порядков, а линейный временной коэффициент потерь варьирует от 1,6 у штамма *E. coli* K12, близкого к дикому, до нескольких десятков у *A. baumannii* ATCC 15308. Напротив, грамположительные бактерии теряют не более половины живых клеток в 1-ю неделю после контакта с сорбентом влаги (средний временной коэффициент потерь по всем 5 штаммам – 1,7). Охлаждение сорбента перед смешиванием с биомассой позволяет существенно снизить величину «теплового удара» по клеткам, что a priori должно повысить выживаемость чувствительных штаммов. Действительно, этот эффект можно наблюдать у большинства исследованных видов грамотрицательных МО – за исключением *A. baumannii*, у которого низкая выживаемость и на охлажденном сорбенте влаги. У грамположительных видов температурный коэффициент потерь ~1, т.е. их выживаемость практически не зависит от начальной температуры сорбента. Возможно, это в меньшей степени относится к стафилококку.

В табл. 3, 4 представлены результаты КСО бактерий на силикагеле с мелкими гранулами АСКГ. В этом случае обеспечивается значительно большая площадь контакта сорбента с биомассой, что должно серьезно изменять динамику потери влаги биомассой и локальные тепловые эффекты.

Из приведенных в табл. 3, 4 результатов видно, что грамотрицательные бактерии плохо переносят КСО с мелким силикагелем. За 1-ю неделю титр живых клеток падает на несколько порядков. Исключение составляет штамм *K. pneumoniae* АТСС 12675, где средний линейный временной коэффициент потерь активности составляет всего 4,5 вместо нескольких сотен единиц величины. Для грамположительных видов картина кинетики потерь не слишком сильно отличается от таковой при использовании крупно гранулированного силикагеля: снижение доли живых клеток невелико или отсутствует (линейный коэффициент ~1). Исключение составили энтерококковый и стафилококковый штаммы, для которых зафиксировано падение доли живых клеток в несколько раз.

В случае предварительного охлаждения сорбента влаги картина аналогична наблюдаемой для сорбента КСМГ. Грамположительные виды были слабо чувствительны к тепловому эффекту сорбции (табл. 4), линейный температурный коэффициент потерь составлял от 1,5 до 3,3. Грамотрицательные виды продемонстрировали значительный разброс по чувствительности. Самым чувствительным оказался штамм *K. pneumoniae* 9, у которого при комнатной температуре сорбента не оставалось определяемых живых клеток. Ацинетобактер при низкой выживаемости в начале контакта в основном сохраняет уровень живых клеток.

В тех случаях, когда биоматериал сохранял активность, близкую к исходной, наблюдение продолжалось до 3 нед. и более. Так, энтерококки могли сохранять от 20 до 70% живых клеток после 2 нед. выдержки с сорбентом, а сенная палочка – от 30 до 90% живых клеток за тот же срок и более.

Заключение

Подытоживая результаты исследования, можно отметить следующее. Для большинства исследованных видов и штаммов бактерий режим, использованный в этой работе для КСО, позволял получить количество живых клеток, достаточное для дальнейшего подробного изучения в стационарной лаборатории. Практически все грамположительные бактерии сохраняли по крайней мере половину живых клеток через 1–2 нед. после смешивания с сорбентом влаги независимо от его начальной температуры, что делает метод КСО пригодным для ускоренно-полевой консервации данного типа бактерий. Такой результат можно считать ожидаемым, имея в виду разнообразие и мощность механизмов адаптации к стрессу у этой группы микроорганизмов [16–19]. Для грамотрицательных бактерий желателен подбор более эффективных защитных сред, поскольку кинетика снижения доли живых клеток в образце в случае сохранения такого же режима КСО требует доставки биоматериала для исследования в стационарную лабораторию не позже конца 1-й недели после смешивания с сорбентом влаги силикагелем.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой научной программы Роспотребнадзора в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ.

Funding

The work was carried out within the framework of the industry scientific program of Rospotrebnadzor at the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology on a unique scientific facility of the Federal Budgetary Institution of Science State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006 Aug;66(2):183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
2. Бекер МЕ, Дамберг БЭ, Рапопорт АИ. Анабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1983;253.
3. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. IX Междунар. науч. конф. (Минск, 7–11 сент. 2015 г.). Минск: Беларуская наука, 2015;192.

4. Похиленко ВД, Баранов АМ, Детушев КВ. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009;4:99-121.
5. Калдарбекова ББ, Арыкпаева УТ, Алмагамбетов КХ, Динкаева КА, Махатова АС, Ескараева АА, и др. Использование адсорбентов для контактно-сорбционного обезвоживания микроорганизмов при хранении субкультур коллекционных штаммов. Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2014;1/2(60):244-246.
6. Патент №1831498 Российская Федерация, МПК C12N 1/04 (1990.01). Способ контактной сушки микроорганизмов № 91 5000377: заявлено 15.08.91: опубликовано 30.07.93. Вирясов СН, Перелыгин ВВ, Биркина ЮС: Патентообладатель(и): Вирясов СН и др. Текст: непосредственный.
7. Патент №2440099 Российская Федерация, МПК A61K 9/14 (2006.01), A61K 35/74 (2006.01), A61K 49/16 (2006.01), A61K 47/04 (2006.01), F26B 5/16 (2006.01). Способ комбинированного обезвоживания высокодисперсных биологически активных материалов: №2009101095/15: заявл. 15.01.2009: опубликовано 20.01.2012. Алёшкин ВА, Давыдкин ВЮ, Давыдкин ИЮ, Мелихова АВ: заявитель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. 7 с. : ил. Текст: непосредственный.
8. Патент №2371479 Российская Федерация, МПК C12N 11/00 (2006.01), A61K 35/74 (2006.01). Комплексный препарат-пробиотик в иммобилизованной и лиофилизированной форме. № 2008104741/13: заявл. 12.02.2008: опубликовано 27.10.2009. Молокеев АВ, Ильина РМ, Яцентюк РМ и др.: заявитель ЗАО Вектор Би-Альгам. 16 с.: ил. Текст: непосредственный.
9. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. J Appl Microbiol. 2008 Jul;105(1):1-13. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x
10. Janning B, in 't Veld PH, Notermans S, Krämer J. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. J Appl Bacteriol. 1994 Sep;77(3):319-24. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03080.x
11. Dangal R, Boyapati T, Muthukumarappan K, Tang J, Ramaswamy R, Yang R. Quantifying bacterial thermal resistance for drying and roasting processes using a novel low-humidity control method. Food Res Int. 2026 Mar 31;228:118429. DOI: 10.1016/j.foodres.2026.118429
12. Alonso S. Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures. Novel Food Fermentation Technologies. In: Ojha K, Tiwari B (eds). Cham: Springer International Publishing. 2016;7-33. DOI: 10.1007/978-3-319-42457-6_2
13. Баранцевич НЕ, Иванова ЛВ, Баранцевич ЕП. *Acinetobacter baumannii*: механизмы антимикробной резистентности. Антибиотики и химиотерапия. 2024;69(11-12):93-100. DOI: 10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-93-100
14. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. Environmental Microbiology. 2004-6;6(6):584-590. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x
15. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):505-20. DOI: 10.1128/CMR.10.3.505
16. Janning B, in 't Veld PH, Notermans S, Krämer J. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. J Appl Bacteriol. 1994 Sep;77(3):319-24. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03080.x
17. Rath H, Reder A, Hoffmann T, Hammer E, Seubert A, Bremer E, et al. Management of Osmoprotectant Uptake Hierarchy in *Bacillus subtilis* via a SigB-Dependent Antisense RNA. Front. Microbiol. 2020;11:622. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00622
18. Kobel PA, Kobel JD, Gamo F-J, Wilson M, Morshedi MM, Navre M, et al. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. Journal of Bacteriology. 2001;183:7318-7328. DOI: 10.1128/JB.183.24.7318-7328.2001
19. Григоров АС, Ажикина ТЛ. Белки холодового шока бактерий как инструмент адаптации к стрессу. Биоорганическая химия. 2023;49(1):23-31. DOI: 10.31857/S0132342323010104

References

1. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006 Aug;66(2):183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
2. Beker ME, Damberg BE, Rapoport AI. Anabiosis of Microorganisms. Riga: Zinatne, 1983;253. (In Russian).
3. Microbial Biotechnologies: Fundamental and Applied Aspects: Abstracts of the 9th International Scientific Conference (Minsk, Sept. 7–11, 2015). Minsk: Belaruskaya Nauka, 2015;192. (In Russian).
4. Pokhilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Methods for Long-Term Preservation of Microbial Collection Cultures and Trends in Their Development. Proceedings of Higher Educational Institutions. Volga Region. Medical Sciences. 2009;4:99-121. (In Russian).
5. Kaldarbekova BB, Arykpayeva UT, Almagambetov KKh, Dinkayeva KA, Makhatova AS, Eskarayeva AA, et al. Use of Adsorbents for Contact-Sorption Dehydration of Microorganisms During the Storage of Subcultures of Collection Strains. Bulletin of KazNU. Biological Series. 2014;1/2(60):244-246. (In Russian).
6. Patent No. 1831498, Russian Federation, IPC C12N 1/04 (1990.01). Method for contact drying of microorganisms, No 91 5000377: filed August 15, 1991; published July 30, 1993. Viryasov SN, Perelygin VV, Birkina YuS; Patent holder(s): Viryasov SN et al. Text: direct. (In Russian).
7. Patent No. 2440099, Russian Federation, IPC A61K 9/14 (2006.01), A61K 35/74 (2006.01), A61K 49/16 (2006.01), A61K 47/04 (2006.01), F26B 5/16 (2006.01). Method for the combined dehydration of highly dispersed biologically active materials: No 2009101095/15: filed Jan. 15, 2009: published Jan. 20, 2012 / Aleshkin VA, Davydkin VYu, Davydkin IYu, Melikhova AV: applicant: G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (FBUN MNIIEM). 7 p.: ill. Text: direct. (In Russian).
8. Patent No 2371479, Russian Federation, IPC C12N 11/00 (2006.01), A61K 35/74 (2006.01). Complex probiotic preparation in immobilized and lyophilized form. No 2008104741/13: filed Feb. 12, 2008: published Oct. 27, 2009. Molokeev AV, Ilyina RM, Yatsentyuk RM, et al.: applicant ZAO Vektor-BiAlgam. 16: ill. Text: direct. (In Russian).
9. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. J Appl Microbiol. 2008 Jul;105(1):1-13. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x
10. Janning B, in 't Veld PH, Notermans S, Krämer J. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. J Appl Bacteriol. 1994 Sep;77(3):319-24. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03080.x
11. Dangal R, Boyapati T, Muthukumarappan K, Tang J, Ramaswamy R, Yang R. Quantifying bacterial thermal resistance for drying and roasting processes using a novel low-humidity control method. Food Res Int. 2026 Mar 31;228:118429. DOI: 10.1016/j.foodres.2026.118429
12. Alonso S. Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures. Novel Food Fermentation Technologies. In: Ojha K, Tiwari B (eds). Cham: Springer International Publishing. 2016;7-33. DOI: 10.1007/978-3-319-42457-6_2
13. Barantsevich NE, Ivanova LV, Barantsevich EP. *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms of Antimicrobial Resistance. Antibiotics and Chemotherapy. 2024;69(11-12):93-100. DOI: 10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-93-100 (In Russian).
14. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. Environmental Microbiology. 2004-6;6(6):584-590. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x
15. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):505-20. DOI: 10.1128/CMR.10.3.505
16. Janning B, in 't Veld PH, Notermans S, Krämer J. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. J Appl Bacteriol. 1994 Sep;77(3):319-24. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03080.x

17. Rath H, Reder A, Hoffmann T, Hammer E, Seubert A, Bremer E, et al. Management of Osmoprotectant Uptake Hierarchy in *Bacillus subtilis* via a SigB-Dependent Antisense RNA. Front. Microbiol. 2020; 11:622. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00622
18. Kobel PA, Kobel JD, Gamo F-J, Wilson M, Morshedi MM, Navre M, et al. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. Journal of Bacteriology. 2001;183:7318-7328. DOI: 10.1128/JB.183.24.7318-7328.2001
19. Grigorov AS, Azhikina TL. Bacterial Cold Shock Proteins as a Tool in Adaption to Stress. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2023;49(1):23-31. DOI: 10.31857/S0132342323010104 (In Russian).

Информация о соавторах:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0768-5295

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-5719-9004

Клыкова Марина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0005-9477-1117

Левчук Владимир Павлович, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0006-3108-0877

Буданова Наталья Юрьевна, кандидат химических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3282-9054

Чукина Ирина Анатольевна, технолог отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-4553-3826

Information about co-authors:

Igor A. Dunaytsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0768-5295

Nina A. Shishkova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher Laboratory of Antrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-5719-9004

Marina V. Klykova, PhD in Biological Sciences, Researcher of Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0005-9477-1117

Vladimir P. Levchuk, Researcher of Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0006-3108-0877

Nataliya Yu. Budanova, PhD in Chemical Sciences, Researcher of Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3282-9054

Irina A. Chukina, Technologist of Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Mikhail V. Khramov, PhD, MD, Leading Researcher at the Laboratory for Nutrient Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-4553-3826

НОВОСТИ НАУКИ

Модель для оценки результативности терапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью



Международная группа исследователей разработала алгоритм оценки вероятности неэффективности терапии при туберкулезе, устойчивом к нескольким лекарствам (МЛУ-ТБ). На основе анализа данных 7 750 пациентов было установлено, что ВИЧ-инфекция является ключевым фактором риска, в то время как более высокий индекс массы тела коррелирует с лучшими прогнозами. Прогностическая точность модели значительно повышается при учете используемых препаратов (бедаквилин, линезолид и левофлоксацин снижают риск; парааминосалициловая кислота – повышают) и динамики конверсии посева мокроты через шесть месяцев.

Разработанная система стратификации пациентов по категориям риска позволяет применять индивидуальный подход к интенсивности наблюдения и выбору терапии. Исследование подтвердило эффективность алгоритма на схеме BPaL, где успех лечения в группе низкого риска составил 97%. В контексте текущей ситуации в России отмечается рост доли МЛУ-ТБ среди впервые выявленных больных (до 32% в 2024 г.), что делает вне дрение персонализированных методов прогнозирования клинически значимым.

Специалисты провели испытания модели, предназначенной для оценки результативности терапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Микробиус [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://microbius.ru/news/spetsialisty-proveli-ispytaniya-modeli-prednaznachennoy-dlya-otsenki-rezultativnosti-terapii-tuberkuleza-s-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivostyu (дата обращения: 06.09.2026).

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-89-92

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 89–92
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 89–92

Разработка способа детекции *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale* на основе LAMP-CRISPR-Cas

И.Ю.Щит, Е.А.Панфёрцев, Т.В.Решетняк, С.Ф.Бикетов

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

Выявление субмикроскопической малярии у бессимптомных носителей остается большой проблемой. Своевременная дифференциация *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale* имеет критическое значение для предотвращения рецидивов малярии, обусловленных реактивацией гипнозоитов в печени. В работе предложен специфичный диагностический метод на основе LAMP-CRISPR/Cas12a для детекции патогенного для человека вида плазмодия: *Plasmodium vivax*. Разработка системы детекции *P. ovale* на основе LAMP-CRISPR/Cas12a продолжается.
Ключевые слова: малярия, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, CRISPR/Cas12a, LAMP, молекулярная диагностика

Для цитирования: Щит И.Ю., Панфёрцев Е.А., Решетняк Т.В., Бикетов С.Ф. Разработка способа детекции *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale* на основе LAMP-CRISPR-Cas. Бактериология. 2026; 11(3): 89–92. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-89-92

A LAMP-CRISPR-Cas-based assay for the detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale*

I.Yu.Shchit, E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, S.F.Biketov

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

Detection of submicroscopic malaria in asymptomatic carriers remains a major challenge. Timely differentiation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* is critical for preventing malaria relapses caused by reactivation of hypnozoites in the liver. This work proposes a specific diagnostic method based on LAMP-CRISPR/Cas12a for detection of human-pathogenic Plasmodium species *P. vivax*. Development of a *P. ovale* detection system based on LAMP-CRISPR/Cas12a is ongoing.
Key words: malaria, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, CRISPR/Cas12a, LAMP; molecular diagnostics

For citation: Shchit I.Yu., Panfertsev E.A., Reshetnyak T.V., Biketov S.F. A LAMP-CRISPR-Cas-based assay for the detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale*. Bacteriology. 2026; 11(3): 89–92. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-89-92

Малярия остается одной из наиболее значимых проблем здравоохранения во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2024 г. зарегистрировано 282 млн случаев заболевания малярией и 610 тыс. смертей от этой инфекции [1]. Хотя виды *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale* не вызывают тяжелых форм заболевания и летальных исходов, они представляют особую эпидемиологическую значимость по нескольким причинам.

P. vivax является доминирующим видом малярии за пределами Африки, вызывая ~70% всех случаев внеафриканской малярии [2]. Оба упомянутых вида плазмодиев обладают способностью формировать гипнозоиты – латентные формы паразита в гепатоцитах, которые могут реактивироваться через недели, месяцы и даже годы после первичной инфекции. Поэтому радикальное излечение невозможно без применения примахина или тафенохина – препаратов, имеющих противопоказания по применению у пациентов с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и беременных женщин [3].

Инфекции, обусловленные *P. vivax* и *P. ovale*, часто характеризуются низкой паразитемией в периферической крови, особенно при хронических формах инфекции или после частичного лечения. Выявить в этом случае паразитов при микроскопии практически невозможно [4].

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0001-9871-8018

Статья поступила 03.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0001-9871-8018

The article was received 03.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

В сравнении с традиционными методами диагностики CRISPR-Cas-системы, изначально открытые в качестве бактериального адаптивного иммунитета [5], показали высокую специфичность при детекции нуклеиновых кислот. Система Cas12a из бактерии *Lachnospiraceae* распознает двухцепочечную ДНК-мишень после связывания с целевой ДНК посредством гидовой РНК и проявляет неспецифическую эндонуклеазную активность в отношении одноцепочечной ДНК, а сигнал детектируется при добавлении в реакцию флуоресцентной репортерной молекулы [6, 7]. Это свойство лежит в основе метода DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) [6]. В случае *vivax*-малярии (трехдневной малярии) в крови часто обнаруживается <1000 паразитов/мкл даже при клинически выраженных признаках заболевания [7]. Это создает большую проблему для методов, не использующих предварительную амплификацию. Было показано, что комбинация рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и Cas12a позволяет достичь предела обнаружения – ~10 копий/реакцию, что соответствует паразитемии ~1–5 паразитов/мкл [8]. На основе CRISPR-Cas-систем были разработаны тесты, способные осуществлять видоспецифичное обнаружение *P. vivax* и *Plasmodium falciparum* – видов, ответственных за большинство случаев малярии во всем мире [9, 10].

Для детекции ДНК возбудителей трехдневной и овале-малярии необходимо найти уникальные последовательности генома, специфичные для каждого вида. Хорошей мишенью для детекции обоих видов малярии является митохондриальная ДНК, т.к. она присутствует в множественных копиях, что может повысить чувствительность детекции при низкой паразитемии.

Цель работы – разработка теста для детекции *P. vivax* и *P. ovale* на основе CRISPR/Cas12a с предварительной амплификацией мишени с помощью петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Материалы и методы

В исследовании использованы образцы цельной крови пациентов с подтвержденным диагнозом завозной малярии. Экстракцию ДНК проводили экспресс-методом с применением Chelex-100. Мишенью для конструирования праймеров и гидовых РНК (гРНК) служила митохондриальная ДНК плазмодиев. Для амплификации LAMP при температуре 65°C в течение 40 мин. Детекцию продуктов проводили с добавлением нуклеазы Cas12a, специфичной гРНК и одноцепочечного флуоресцентного ДНК-репортера. Измерение уровня флуоресценции осуществляли в реальном времени при 37°C в течение 20 мин. В работе использовали ферменты Trx-Cas12a и Trx-Bst-полимеразу, полученные в отделе иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ [11, 12].

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе оптимизации параметров реакции определены критические концентрации компонентов: 33 нМ Cas12a, 33 нМ гРНК и 500 нМ флуоресцентного репортера 8CFQ обеспечивали максимальную скорость транс-расщепления репортера. Аналитический предел обнаружения составил 5 паразитарных геномов/мкл для системы детекции *P. vivax*. Выявить ДНК *P. ovale* не удалось. Вероятно, неудача при детекции ДНК *P. ovale* возникла из-за дизайна LAMP-праймеров (неоптимальной Tm/GC-архитектуры F1c/B1c). По причине экстремального АТ-состава плазмодиев и высокого сходства (80–90%) в кодирующих регионах митохондриальной ДНК подобрать 6 праймеров на один короткий участок мтДНК невероятно сложно. При оценке перекрестной реактивности системы детекции *P. vivax* с ДНК *P. falciparum*, *Plasmodium malariae*, *P. ovale* и *Plasmodium knowlesi* ложноположительных сигналов зарегистрировано не было. Разработанный подход позволил надежно дифференцировать вид *P. vivax* благодаря высокой специфичности распознавания PAM-сайтов.

CRISPR-ассоциированные методы детекции представляют собой перспективную альтернативу традиционным подходам к диагностике малярии, вызванной *P. vivax* и *P. ovale*. Высокая чувствительность, возможность визуализации без сложного оборудования и потенциал для мультиплексирования делают эти технологии особенно привлекательными для применения в условиях ограниченных ресурсов. В перспективе – мультиплексная детекция: разные гРНК в одной реакции с репортерами с разными флуоресцентными метками. Разработка термостабильных вариантов Cas-белков может устранить необходимость в холодовой цепи, что критически важно для применения в эндемичных регионах Африки и Юго-Восточной Азии. CRISPR-методы могут быть адаптированы для детекции мутаций, ассоциированных с резистентностью к хлорохину или примахину.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на разработку методов детекции гипнозоитов в печени, что важно для диагностики рецидивирующих форм малярии. Также важно отметить, что *P. ovale* был разделен на два подвида – *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri* – на основе молекулярных исследований в 2012 г. [13]. Эти виды имеют ~5% дивергенции в геноме, поэтому основная научная задача – не просто обнаружить *P. ovale*, а точно дифференцировать его подвид. Дифференциальная идентификация *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri* может быть достигнута за счет выбора высококонсервативных и уникальных участков генома, специфичных для каждого вида, или дизайна отдельных гРНК при использования общих консервативных участков генома.

Заключение

Разработанный метод LAMP-CRISPR/Cas12a является чувствительным и специфичным инструментом диагностики возбудителя малярии *P. vivax*.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках СЩ_1 по Госзаданию в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ.

Funding

The work was carried as part of SS_1 under a State Assignment at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology ona unique scientific facility of the SRCAMB.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. World malaria report 2025: addressing the threat of antimalarial drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2025. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Nkumama IN, O'Meara WP, Osier FHA. Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. Trends Parasitol. 2017 Feb;33(2):128-140. DOI: 10.1016/j.pt.2016.11.006
3. Watson J, Taylor WRJ, Bancone G, Chu CS, Jittamala P, White NJ. Implications of current therapeutic restrictions for primaquine and tafenoquine in the radical cure of vivax malaria. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Apr 20;12(4):e0006440. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006440
4. Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic techniques for malaria control. Trends Parasitol. 2001 Jul;17(7):307-9. DOI: 10.1016/s1471-4922(01)01925-0
5. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic *Archaea* and bacteria predicted by genomic context analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):482-96. DOI: 10.1093/nar/30.2.482
6. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science. 2018 Apr 27;360(6387):436-439. DOI: 10.1126/science.aar6245
7. Song HH, O SO, Kim SH, Moon SH, Kim JB, Yoon JW, et al. Clinical features of *Plasmodium vivax* malaria. Korean J Intern Med. 2003 Dec;18(4):220-4. DOI: 10.3904/kjim.2003.18.4.220
8. Zheng M, Zhang M, Li H, Wu S, Zhao Y, Zhang J, et al. Rapid, sensitive, and convenient detection of *Plasmodium falciparum* infection based on CRISPR and its application in detection of asymptomatic infection. Acta Trop. 2024 Jan;249:107062. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.107062
9. Lee RA, Puig H, Nguyen PQ, Angenent-Mari NM, Donghia NM, McGee JP, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Oct 13;117(41):25722-25731. DOI: 10.1073/pnas.2010196117
10. Cunningham CH, Hennelly CM, Lin JT, Ubalee R, Boyce RM, Mulogo EM, et al. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. EBioMedicine. 2021 Jun;68:103415. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103415
11. Патент №2852392 Российская Федерация, МПК C12N 15/10 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01). Нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантную нуклеазу Trx-Cas12a, рекомбинантная плазмидная ДНК pETCas12aNB, кодирующая нуклеазу Trx-Cas12a, рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/pETCas12aNB – продуцент нуклеазы Trx-Cas12a, нуклеаза Trx-Cas12a и способ ее получения: N 2024134110: заявл. 14.11.2024: опубликовано 08.12.2025. Панфёрцев ЕА, Решетняк ТВ, Шевяков АГ, Левчук ВП, Соловьев ПВ, Горбатов АА, и др.; заявитель ФБУН ГНЦ ПМБ.
12. Щит ИЮ, Панферцев ЕА, Решетняк ТВ, Фёдоров ТВ, Бикетов СФ. Разработка лиофильно высушенной тест-системы на основе изотермической амплификации (LAMP) для диагностики малярии. Бактериология. 2025;10(4):10-15. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-10-15
13. Snounou G, Sharp PM, Culleton R. The two parasite species formerly known as *Plasmodium ovale*. Trends Parasitol. 2024 Jan;40(1):21-27. DOI: 10.1016/j.pt.2023.11.004

References

1. World malaria report 2025: addressing the threat of antimalarial drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2025. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Nkumama IN, O'Meara WP, Osier FHA. Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. Trends Parasitol. 2017 Feb;33(2):128-140. DOI: 10.1016/j.pt.2016.11.006
3. Watson J, Taylor WRJ, Bancone G, Chu CS, Jittamala P, White NJ. Implications of current therapeutic restrictions for primaquine and tafenoquine in the radical cure of vivax malaria. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Apr 20;12(4):e0006440. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006440
4. Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic techniques for malaria control. Trends Parasitol. 2001 Jul;17(7):307-9. DOI: 10.1016/s1471-4922(01)01925-0
5. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic *Archaea* and bacteria predicted by genomic context analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):482-96. DOI: 10.1093/nar/30.2.482
6. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science. 2018 Apr 27;360(6387):436-439. DOI: 10.1126/science.aar6245
7. Song HH, O SO, Kim SH, Moon SH, Kim JB, Yoon JW, et al. Clinical features of *Plasmodium vivax* malaria. Korean J Intern Med. 2003 Dec;18(4):220-4. DOI: 10.3904/kjim.2003.18.4.220
8. Zheng M, Zhang M, Li H, Wu S, Zhao Y, Zhang J, et al. Rapid, sensitive, and convenient detection of *Plasmodium falciparum* infection based on CRISPR and its application in detection of asymptomatic infection. Acta Trop. 2024 Jan;249:107062. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.107062
9. Lee RA, Puig H, Nguyen PQ, Angenent-Mari NM, Donghia NM, McGee JP, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria. Proc Natl

Acad Sci U S A. 2020 Oct 13;117(41):25722-25731. DOI: 10.1073/pnas.2010196117

10. Cunningham CH, Hennelly CM, Lin JT, Ubalee R, Boyce RM, Mulogo EM, et al. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. EBioMedicine. 2021 Jun;68:103415. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103415
11. Patent No 2852392, Russian Federation, IPC C12N 15/10 (2006.01), C12N 9/22 (2006.01). Nucleotide sequence encoding the recombinant nuclease Trx-Cas12a; recombinant plasmid DNA pETCas12aNB encoding the nuclease Trx-Cas12a; recombinant bacterial strain *Escherichia coli* BL21(DE3)/pETCas12aNB, a producer of the nuclease Trx-Cas12a; nuclease Trx-Cas12a; and a method for its production. Application No. 2024134110: filed Nov. 14, 2024; published Dec. 8, 2025. Inventors: Panfortsev EA, Reshetnyak TV, Shevyakov AG, Levchuk VP, Solovyev PV, Gorbatov AA, et al.; Applicant: FBUN GNTs PMB. (In Russian).
12. Shchit IYu, Panfertsev EA, Reshetnyak TV, Fedorov TV, Biketov SF. Development of a freeze-dried isothermal amplification (LAMP) assay for malaria diagnostics. Bacteriology. 2025;10(4):10-15. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-10-15 (In Russian).
13. Snounou G, Sharp PM, Culleton R. The two parasite species formerly known as *Plasmodium ovale*. Trends Parasitol. 2024 Jan;40(1):21-27. DOI: 10.1016/j.pt.2023.11.004

Информация о соавторах:

Панфёрцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1951-8067

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1179-6895

Information about co-authors:

Evgeny A. Panfertsev, PhD, MD, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Tatyana V. Reshetnyak, Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1951-8067

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1179-6895

НОВОСТИ НАУКИ

Парадоксальная активация Th1



Cryptococcus neoformans является основным возбудителем криптококкового менингита у лиц с иммунодефицитом. Напротив, у лиц с сохранным иммунитетом C. neoformans вызывает латентную легочную инфекцию, характеризующуюся отсутствием клинических симптомов. Используя мышиную модель ингаляционного заражения латентной инфекцией *C. neoformans*, ранее было показано, что CD4+ Т-клетки необходимы для предотвращения размножения грибка в легких. В текущем исследовании проведено секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq) и обнаружено, что ответ CD4+ Т-клеток во время легочной инфекции *C. neoformans* был как высоко гетерогенным, так и дихотомическим, с сопутствующей экспрессией генов, связанных с поляризацией Th1 (Tbx21 и Ifng), и иммунной регуляцией (Ctla4). Продемонстрировано, что клеток с фенотипом, подобным Th1, достаточно и необходимо для контроля латентной инфекции посредством адаптивного переноса Tbet-положительных клеток в мышей с дефицитом CD4, зараженных соответствующим штаммом. Анализ scRNA-seq выявил, что субпопуляция эффекторных CD4+ Т-клеток, коэкспрессирующих Ctla4 и Gata3, была значительно выше, чем субпопуляция, коэкспрессирующая Ctla4 и Tbx21. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что аппрегуляция CTLA-4 полезна для борьбы с инфекцией C. neoformans, так как блокада CTLA-4 способствовала размножению грибка. Таким образом, предложена модель, в которой контроль латентной инфекции C. neoformans со стороны Th1 поддерживается подавлением вредоносной активации Th2 посредством CTLA-4.

Ding M, Drnevich J, Yoder JM, Dang EV, Nielsen K.
Paradoxical Th1 activation and CTLA-4 regulation is beneficial during latent cryptococcosis.
mBio. 2026 Aug 12;17(8):e0152826. DOI: 10.1128/mbio.01528-26

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-93-106

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 93–106
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 93–106

Влияние экологических стрессов на композиционный состав экзосом (внеклеточных везикул) микроорганизмов

Е.С.Шипко, О.В.Дуванова

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

Многие биологически активные соединения, образуемые комменсальными, симбиотическими и патогенными микроорганизмами, могут передаваться посредством специализированных наноструктур – экзосом. Экологические стрессы оказывают влияние на биогенез экзосом, сортинг молекулярного груза и их функциональную значимость. Данный обзор посвящен изучению особенностей биогенеза экзосом и сортировки специфических грузов в условиях окислительного, температурного, pH-, осмотического, токсического стрессов, а также стресса, индуцированного дефицитом питательных веществ. Отмечено, что изучение закономерностей изменений композиционного состава экзосом под действием стрессов может быть полезным для установления их роли в реализации адаптационного/персистентного, патогенетического, биосинтетического потенциала микроорганизмов, а также для совершенствования специфической профилактики инфекционных болезней.

Ключевые слова: экзосомы, микроорганизмы, экологические стрессы, композиционный состав экзосом

Для цитирования: Шипко Е.С., Дуванова О.В. Влияние экологических стрессов на композиционный состав экзосом (внеклеточных везикул) микроорганизмов. Бактериология. 2026; 11(3): 93–106. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-93-106

Influence of environmental stresses on the composition of exosomes (extracellular vesicles) of microorganisms

E.S.Shipko, O.V.Duvanova

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Researsh Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Many biologically active compounds formed by commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms can be transferred to local and remote targets through specialized nanostructures called exosomes. Environmental stresses have an impact on exosome biogenesis, molecular cargo sorting, and their functional significance. The review examines the features of exosome biogenesis and sorting of specific cargoes under conditions of oxidative, temperature, pH, osmotic, toxic stress, as well as stress induced by nutrient deficiency. It has been noted that studying the patterns of changes in the compositional composition of exosomes under stress can be useful for establishing their role in realizing the adaptive/persistent, pathogenetic, and biosynthetic potential of microorganisms, as well as for improving the specific prevention of infectious diseases.

Key words: exosomes, microorganisms, environmental stresses, composition of exosomes

For citation: Shipko E.S., Duvanova O.V. Influence of environmental stresses on the composition of exosomes (extracellular vesicles) of microorganisms. Bacteriology. 2026; 11(3): 93–106. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-93-106

В последние десятилетия исследователи изучают продукцию, регуляцию и функциональность экзосом с позиции механизмов персистенции/адаптации микроорганизмов. Стала накапливаться информация, что многие биологически активные соединения, включая стрессопротекторы и адаптогены, образуемые бактериями, археями, молликутами, грибами, простейшими, могут продуцироваться в окружающую среду в составе экзосом и транспортироваться в локальные целевые пункты. Варьируя специфику «молекулярного груза», микроорганизмы задействуют экзосомы в различных аспектах своей жизнедеятельности, в т.ч. в патофизиологических процессах, межвидовой/межцарственной коммуникации, а также в реакциях на стресс. Воздействие абиотических и биотических факторов среды приводит к

Для корреспонденции:

Шипко Елена Сергеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9133
E-mail: shipko_es@antiplague.ru
ORCID: 0000-0002-8517-2789

Статья поступила 14.03.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Elena S. Shipko, Junior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9133
E-mail: shipko_es@antiplague.ru
ORCID: 0000-0002-8517-2789

The article was received 14.03.2026, accepted for publication 30.09.2026

образованию гетерогенных групп экзосом, различающихся по морфологии, плотности, молекулярному статусу, «адресной» доставке и функциональной значимости. В связи с этим актуальными являются исследования, направленные на изучение особенностей биогенеза и молекулярного сортинга экзосом в условиях экологических стрессов, чему и будет посвящен данный обзор.

Биогенез экзосом

Долгое время экзосомы считались всего лишь пакетами с клеточным «мусором». Однако дальнейшие исследования показали, что это не отходы клетки, а важные факторы клеточного сигналинга и репрограммирования.

Экзосомы высвобождаются на всех стадиях клеточного роста, в жидкой и агаровой культурах, а также в биопленках, где они являются частью внеклеточного матрикса. Грамотрицательные бактерии продуцируют несколько типов экзосом: моноламилярные, образованные только внешней мембраной (Outer Membrane Vesicles/OMV) и би- и мультиламилярные, сформированные наружной и внутренней (цитоплазматической) мембранами (Outer-Inner Membrane Vesicles/O-IMV). У грамположительных бактерий, молликут, архей экзосомы сформированы только цитоплазматической мембраной и называются мембранными везикулами (Membrane Vesicles/MV). Микроорганизмы также формируют нитевидные структуры, способствующие передаче молекулярного груза в синергетическом или антагонистическом режиме от клетки к клетке: нанооподы, или нанотрубки (Tubular Membranous Structures/TSMS). Изначально нанооподы были обнаружены у гипертермофильных бактерий, однако позднее их нашли и у других бактерий, включая *Firmicutes*, *Myxobacteria*, *Proteobacteria*, а также у *Archea* и *Protozoa*.

Несмотря на то, что исследование экзосом у микроорганизмов насчитывает не одно десятилетие, до конца механизмы их образования не изучены. В настоящее время в литературе описано 3 основных механизма биогенеза экзосом у грамотрицательных бактерий:

• ослабление локальных связей между внешней мембраной и пептидогликаном, что приводит к отслоению и высвобождению внешней мембраны в виде экзосом;

• увеличение тургорного давления вследствие накопления фрагментов пептидогликана, липополисахарида (ЛПС) или неправильно свернутых белков в периплазме, приводящее к вздутию и отщеплению бактериальной мембраны;

• ремоделирование состава клеточной мембраны: структуры ЛПС, протеома, липидома внешней и цитоплазматической мембран, локально изменяющее биофизические характеристики мембраны и способствующее везикуляции [1].

В отношении биогенеза MV грамположительных бактерий существует несколько гипотез, но ни одна из них не является общепринятой. В целом считается, что в основе данного процесса лежит расщепление клеточной стенки гидролазами пептидогликана, обеспечивающее высвобождение MV. Кроме того, при спонтанной или индуцированной активации профага может реализовываться еще один механизм биогенеза – эксплозивный лизис клеток, сопровождающийся фрагментацией бактериальных мембран, которые затем скручиваются и самовосстанавливаются, образуя экзосомы. Продуцируемые по данному механизму экзосомы имеют, как правило, малые размеры (микровезикулы), обогащены цитозольными белками, молекулами нуклеиновых кислот, а в некоторых случаях – нитевидными белковыми структурами (фимбриями) [2]. Экзосомы архей, грибов и паразитов образуются как прямым «почкованием» плазматической мембраны, так и при участии клеточных компартментов (таких как аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум (грибы, паразиты)), а также мультибелковых эндосомальных сортировочных комплексов (Endosomal Sorting Complex Required for Transport/ESCRT), регулирующих поступление груза в состав экзосом и их формирование.

Различные механизмы биогенеза не исключают друг друга и могут быть активированы при определенных условиях, в частности стрессах.

Композиционный состав экзосом

Везикулярные структуры нагружены специфическими компонентами, которые локализуются как на поверхности экзосом, так и внутри: белками, углеводами, липидами, нуклеиновыми кислотами, пептидогликанами, первичными и вторичными метаболитами и др.

В настоящее время созданы базы данных: Vesiclepedia, EVpedia и ExoCarta, в которых содержится информация обо всех детектированных в экзосомах соединениях. Также разработана краудсорсинговая платформа EV-TRACK, концентрирующая знания по биологии и методологии экзосом.

С помощью методов тонкослойной, жидкостной и газовой хроматографии и масс-спектроскопии идентифицировано >2000 липидов в экзосомах, выделенных из разных биологических образцов. В составе бактериальных экзосом наиболее часто детектируют: фосфатидные кислоты, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол и кардиолипин. Экзосомы, секретируемые грамотрицательными бактериями, содержат большое количество ЛПС. Экзосомы грибов и паразитов, помимо фосфолипидов, обогащены сфинголипидами и стеролами: ланостеролом, эргостеролом (грибы) и холестерином (паразиты), экзосомы архей – глицерином и терпеноидами (геранилгераниолом, фитанилом и др.).

Липиды не только играют структурную роль в мембранах экзосом, но и являются важными участниками их биогенеза:

• изменение степени ацилированности липида А влияет на текучесть мембраны, заряд, содержание мембраносвязанных белков и динамику везикулогенеза грамотрицательных бактерий [3];

• локальное асимметричное накопление или истощение липидных молекул, имеющих форму конуса, таких как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, кардиолипин, фосфатидная кислота, увеличивает отрицательную кривизну мембраны, приводя к выпячиванию клеточной мембраны и последующему высвобождению экзосом [4];

• структура жирных кислот (ЖК) также является важным фактором в биогенезе экзосом, оказывая влияние на текучесть и изгиб клеточной мембраны. Так, у психрофильной бактерии *Pseudomonas syringae* и орального патогена *Capnocytophaga ochracea* за биогенез экзосом ответственны липиды, обогащенные ненасыщенными разветвленными ЖК, увеличивающие текучесть мембраны [5]. У *Streptococcus pneumonia* и *Bacillus anthracis* экзосомальные липиды содер-

жат в изобилии насыщенные ЖК, но более короткоцепочечные (C14:0 и C16:0) по сравнению с липидами исходных клеток (C18:0) [6]. Напротив, экзосомы *Pseudomonas aeruginosa* были обогащены длинноцепочечными насыщенными ЖК, что позволяет предполагать, что более жесткие участки внешней мембраны также могут играть роль в формировании экзосом [7];

• функциональные микродомены клеточной мембраны (липидные рафты), обогащенные специфическими липидами, такими как фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, сфинголипиды/цереброзиды, диацилглицерины, плазмалогены, холестерин или полиизопреноиды, в силу уникальных физических свойств (большей жесткости, микровязкости, толщине по сравнению с остальной частью мембраны) увеличивают спонтанную кривизну мембраны и способствуют формированию экзосом [8].

Необходимо отметить, что липиды экзосом не являются статичными химическими соединениями. Они могут подвергаться ряду ферментативных (при помощи липаз, синтаз, редуктаз, оксидаз) и неферментативных реакций: окислению, нитрованию, сульфатированию, галогенированию, приводящих к образованию новых типов липидов с альтернативными свойствами: сульфолипидов (участвуют в адаптации, сигналинге), нитролипидов (регулируют ключевые адаптивные сигнальные пути, участвуют в клеточном гомеостазе и воспалительном ответе), галогенированных липидов (влияют на физические свойства и функции мембран, выступают в качестве сигнальных молекул, участвуют в межклеточной коммуникации, модулируют клеточную активность, воспаление), оксилипинов (участвуют в межклеточной коммуникации, модулируют иммунные реакции, способствуют как защите, так и патогенезу) и других типов. Более того, липидный состав экзосом определяет кинетику интернализации экзосомального груза в клетку-мишень. Так, экзосомы, содержащие ЛПС с измененным О-антигеном (укороченным или полностью редуцированным), доставляют груз в клетку посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза, в то время как присутствие интактного О-антигена обеспечивает доставку через липидные рафты и рецепторы [9].

В последние 20 лет активно проводится белковый и метаболомный профайлинг экзосом с помощью методов масс-спектрометрии, вестерн-блоттинга, флуоресцентных и изотопных меток, иммуноэлектронной и атомно-силовой микроскопии. Показано, что протеом экзосом включает поверхностно расположенные, ассоциированные с мембраной и локализованные в везикулярной полости белки. Большинство мембраносвязанных белков в экзосомах происходят из цитоплазматической мембраны, а интраэкзосомальные белки являются цитозольными белками, упакованными во время везикулогенеза. Важно отметить, что набор экзосомальных белков нередко отличается от набора белков в периплазме, цитоплазме, плазматической мембране исходных клеток, что позволяет предположить, что они могут загружаться в соответствии со специфическими, пока еще не расшифрованными механизмами сортинга. Белки, детектированные в экзосомах, принадлежат к различным функциональным категориям, включая структурные белки наружной и плазматической мембран, порины, ионные каналы, транспортеры, рецепторы, активные ферменты периплазмы и цитозоля, эффекторы, а также белки, связанные с реакциями на стресс. Секретируемые в составе везикул ферменты – гемолизины, металлозависимые протеазы, липазы – обладают свойствами токсинов [1]. Протеомные исследования экзосом различных видов бактерий выявили ряд белков, связывающих ионы металлов, что может быть использовано микроорганизмами в условиях их дефицита [10].

В процессе биогенеза в экзосомы могут загружаться метаболиты:

• первичные: сахара, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, коферменты, витамины, спирты, органические кислоты и другие соединения;

• вторичные (биоактивные специализированные): обладающие антибактериальной и антифунгицидной активностью (литические ферменты, бактериоцины, антибиотики) [11]; метаболиты, ответственные за межклеточную коммуникацию (ацилгомосерин-лактоны, аминокетоны, хинолиновые регуляторы, свободные ненасыщенные ЖК и др.) [12]; морфогенез (высокогидрофобные сульфолипиды, сесквитерпены, дитерпены, свободные ЖК) [13]; хелатирование металлов (сидерофоры) [10] и другие функции.

Экзосомы солюбилизируют, стабилизируют и концентрируют эти классы молекул, облегчая их распределение между микроорганизмами в жидкой среде. Кроме того, экзосомы, вырабатываемые некоторыми бактериями, содержат нейроактивные метаболиты: γ-аминомасляную кислоту, производные триптофана, катехоламины и связанные с ними ключевые ферменты биосинтеза, модулирующие ось «кишечник–мозг» и иммунные реакции организма хозяина. При помощи комплексного протеомно-метаболомного профилирования и молекулярно-биологических карт данных (BioCyc, BRITE, EMP, KEGG, MetaCyc, MPW, SPAD, PDB и др.) реконструированы некоторые метаболические пути, в которые вовлечены компоненты молекулярного груза экзосом: гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, метаболизм аминокислот, обмен азотистых оснований, реакции синтеза ДНК и РНК, перекисного окисления липидов [14].

Экзосомы способны упаковывать и транспортировать фрагменты ДНК (плазмидную ДНК, кодирующую хромосомную ДНК или некодирующую ДНК), РНК (матричные, рибосомальные, транспортные, малые, микро-), являясь неканоническим механизмом секреции бактериальных, грибковых, паразитарных нуклеиновых кислот, позволяющим им проникать внутрь клеток-мишеней посредством прямого слияния мембран, липидных рафтов, эндоцитоза (клатрин- или кавеолин-опосредованного, макропиноцитоза) и играть функциональную роль во взаимодействии между хозяином и патогеном [15]. Примечательно, что большая часть ДНК находится на внешней поверхности экзосом и лишь сравнительно небольшое количество – внутри. Внешняя ДНК охватывает весь геном, тогда как внутренняя, заключенная в экзосомальную полость (люминальная ДНК), часто избирательно обогащена генами, участвующими в различных биологических функциях. В настоящее время показано, что экзосомы могут способствовать межвидовому и внутривидовому обмену ДНК (везидукции), обеспечивая передачу генов (в т.ч. устойчивости к антибиотикам и факторов вирулентности), играть роль в формировании и распространении бактериальных биопленок, способствуя колонизации макроорганизма. Данный факт

позволяет предположить, что ДНК, ассоциированная с экзосомами, может играть важную роль в патогенезе бактерий [16].

МикроРНК, идентифицированные в составе везикул с помощью высокопроизводительного секвенирования, могут функционировать как новые сигнальные молекулы, опосредующие взаимодействие микроорганизмов с макроорганизмом, а именно: регулировать экспрессию генов хозяина, опосредовать активность связанных с инвазией бактериальных, грибковых, паразитарных эффекторов и генов вирулентности, необходимых для внутриклеточного выживания патогена, а также ингибировать продукцию цитокинов, ослабляя иммунный ответ хозяина, способствуя выживанию микроорганизма [17].

Экологические стрессы влияют на интенсивность везикуляции, архитектуру (размер и тип экзосомальных структур), сортинг молекулярного груза, приводя к развитию гипо- или гипервезикуляционного фенотипа и образованию экзосом, обогащенных теми или другими компонентами.

Оксидативный стресс

Микроорганизмы в процессе энергетического метаболизма постоянно подвергаются воздействию эндогенных и экзогенных активных форм кислорода (АФК) или азота, которые играют важную роль в физиологических (передача сигналов) и патологических процессах (фрагментация белков, перекисное окисление липидов, повреждение нуклеиновых кислот) (рис. 1).

Для противодействия выработке АФК и их вредному воздействию микроорганизмы активируют антиоксидантную систему, включающую ферменты и биоактивные вещества (глутатион, β-каротин, ликопин, менахиноны и др.), часть компонентов которой высвобождается в составе везикул в качестве антиоксидантного груза. Молекулы-антиоксиданты, встроенные в экзосомы, поглощают свободные радикалы и нейтрализуют токсичные производные кислорода и азота, защищая клетки от повреждения. Так, поверхность экзосом Helicobacter pylori была обогащена каталазой (KatA), которая противодействует респираторному взрыву хозяина за счет нейтрализации H_2O_2 и NaClO, вырабатываемых нейтрофилами [18]. Экзосомы *Borrelia burgdorferi* содержали супероксиддисмутазу, которая служит для нейтрализации супероксида [19]. В составе экзосом *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, полученных в условиях, имитирующих фагосомальную среду, детектировано четыре антиоксидантных фермента: супероксиддисмутаза, каталаза, каталазопероксидаза и алкилгидропероксидредуктаза [20]. Необходимо отметить, что, за исключением супероксиддисмутазы, остальные три белка были специфичными для экзосом, продуцируемых в условиях оксидативного стресса. Клетки *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* под действием H_2O_2 секретировали экзосомы, обогащенные пероксидазой/каталазой (KatG), которая подавляет активацию макрофагов и выработку цитокинов, метионинсульфоксидредуктазами A и B (MsrA, MsrB): ферментами, восстанавливающими белки, инактивированные окислением [21]. Оба фермента активируются на ранних стадиях заражения, играя важную роль во внутриклеточной репликации *F. tularensis* в макрофагах.

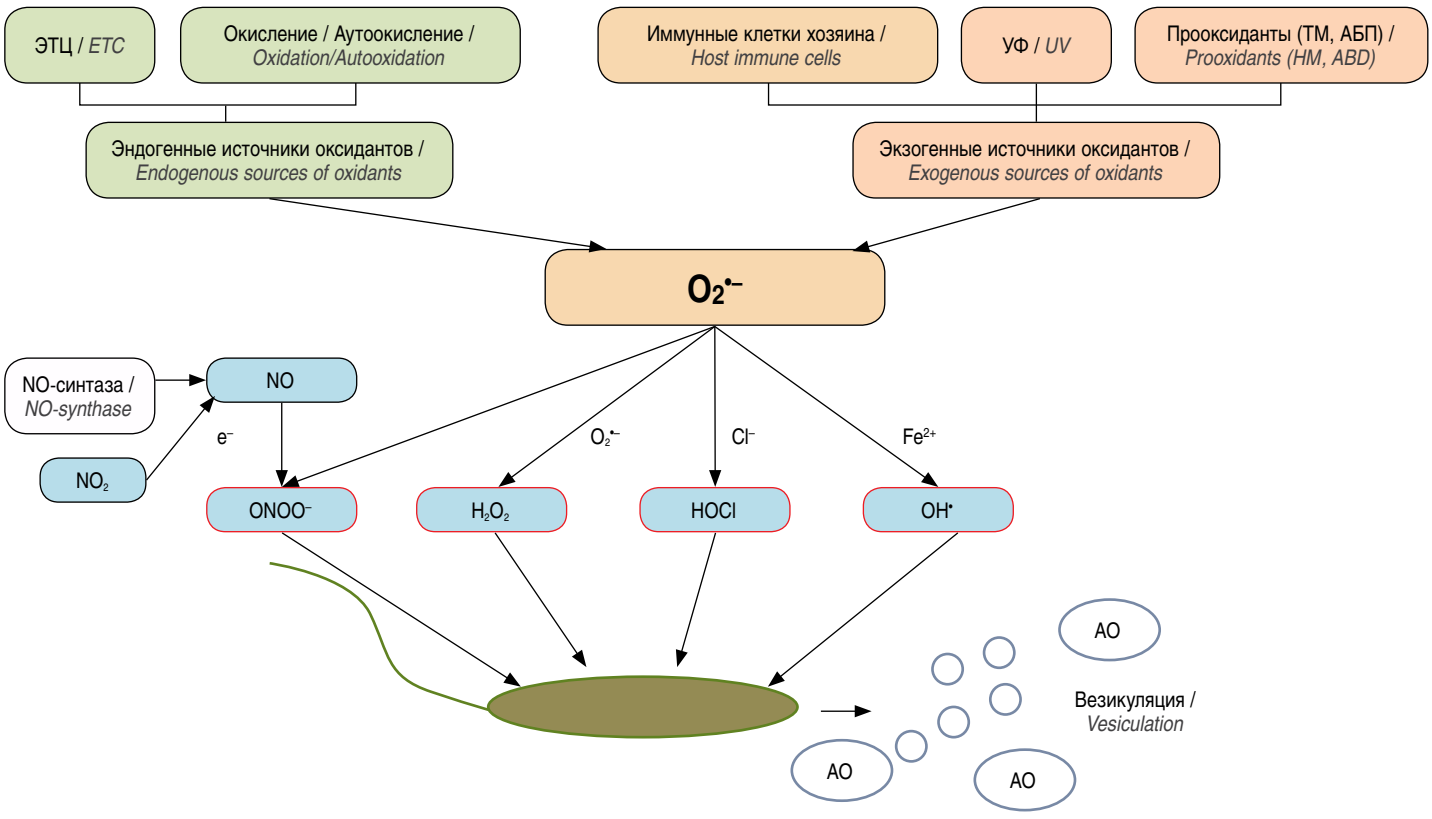


Рис. 1. **Влияние оксидантов на везикуляцию микроорганизмов. ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; ТМ – тяжелые металлы; АБП – антибактериальные препараты; АО – антиоксиданты.**
Fig. 1. ***Effect of oxidants on microbial vesiculation. ETC – electron transport chain; HM – heavy metals; ABD – antibacterial drugs; AO – antioxidants.***

У некоторых патогенных бактерий окислительный стресс приводил не только к интенсификации везикуляции, но и к увеличению инвазивного и цитотоксического потенциала экзосом. Так, экзосомы *Serratia grimesii* проявляли больший цитотоксический эффект по отношению к эукариотическим клеткам-мишеням (клеткам кишечного эпителия) по сравнению с исходными бактериальными клетками за счет обогащения экзосом в условиях оксидативного стресса металлопротеазами, такими как гримелизин, нарушающими целостность мембраны клеток хозяина и способствующими инвазии патогена [22]. *P. aeruginosa* под действием NO увеличивал продукцию F- и R-пиоцинов, большая часть которых включалась в состав экзосом для доставки бактериям-конкурентам [23]. Экзосомы *M. avium*, полученные в условиях окислительного стресса, помимо антиоксидантов были обогащены белками, необходимыми для персистенции патогена в макроорганизме: трегалозосинтазой, белками теплового шока, ферментом глиоксилатного цикла, изоцитратлиазой и белками семейства PE/PPE («средства индивидуальной защиты» от иммунной системы хозяина). Более того, под действием экзогенных окислителей *M. avium* инкапсулировал в экзосомах многочисленные белки-эффекторы, в т.ч. глутаминсинтетазу и белок Eis из семейства аминогликозид-N-ацетилтрансфераз, способный контролировать выработку провоспалительных цитокинов, а также ацетилировать эукариотические гистоны и биологически-активные арилалкиламины. Пять из детектированных эффекторных молекул были обнаружены в цитозоле макрофагов THP-1 человека [22]. Необходимо отметить тот факт, что некоторые бактерии в условиях окислительного стресса экспортируют в составе экзосом эффекторы контакт-зависимых систем секреции, в частности T6SS. Которые, как было показано в ряде работ, не транслоцируются в эукариотические и прокариотические клетки-мишени, а служат для координации действия сидерофоров, связывания (из окружающей среды или организма-хозяина) и доставки бактериям-продуцентам соединений-гасителей АФК [24].

ЭЗ также были обогащены липопротеинами наружной мембраны, выполняющими функцию переносчиков и играющими важную роль в поглощении и экспорте питательных веществ, необходимых для поддержания клеточного гомеостаза во время и после окислительного стресса, биоактивными метаболитами (оксилипины, лизофосфолипиды), участвующими в клеточном сигналинге и реализации адаптивных реакций клетки на стресс [25].

Таким образом, экзосомы, продуцируемые в условиях оксидативного стресса, повышали антиоксидантный и патогенетический потенциал микроорганизмов, защищая клетки от окислительного повреждения и помогая противостоять внутренним системам защиты макроорганизма.

Температурный стресс

Температура является одним из важных параметров окружающей среды, оказывающих значительное влияние на различные процессы жизнедеятельности микроорганизмов, включая биогенез экзосом: интенсивность процесса, морфологию и состав. Так, термический стресс индуцировал везикуляцию у *Escherichia coli* [26], *F. tularensis* [21], *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* [27], а холодовой – у *Serratia marcenscens*, *S. grimesii* [28], *Staphylococcus aureus* [29], *Yersinia enterocolitica* [30]. Возбудитель чумы активировал выработку экзосом как при повышении температуры культивирования до 37°C, так и под воздействием холодового шока (4°C) [31]. Паразитические простейшие, подобно бактериальным агентам, изменяли интенсивность везикуляции под действием температурного фактора: возбудитель болезни Шагаса *Trypanosoma cruzi* наращивал производство экзосом при холодовом стрессе (4°C), тогда как *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani*, напротив, увеличивали везикулогенез при термическом стрессе (увеличение температуры с 26°C до 37°C) [32].

Изучение субклеточной локализации белков, загруженных в экзосомы при температурном стрессе (как холодовом, так и тепловом), выявило преобладание белков цитозоля и периплазмы. В то же время уникальные экзосомальные белки, характерные для определенного температурного режима культивирования, часто связаны с мембранной сигнатурой. Например, экзосомы *S. marcenscens*, секретируемые при 30°C, были обогащены белками OmpX, OmpC/F, OmpA, OmpW, тогда как при 37°C содержание белков OmpC/F и OmpX в экзосомах было резко снижено, а OmpA не детектировался [28]. Экзосомы *Y. enterocolitica*, полученные при 15°C, несли уникальный мембранный белок молекулярной массой 45–60 кДа, отсутствующий в экзосомах, полученных при 28°C и 37°C [30].

Переключение температурного режима с 25–30°C на 37–42°C, имитирующее проникновение микроорганизмов в организм теплокровного хозяина, не только активировало выработку экзосом у многих патогенных микроорганизмов, но и приводило к обогащению их факторами вирулентности (табл. 1).

Экзосомы *F. tularensis*, полученные при 37–42°C, не только были обогащены факторами вирулентности, но и имели специфический тубулярный фенотип, в отличие от экзосом типичной сферической формы, секретируемых при 25°C (температуре окружающей среды), чей протеом был обогащен белками, связанными с липидным метаболизмом: синтезом О-антигена (О-антиген полимеразы, флиппазы, формилтрансферазы), липида А, экспортом ЛПС, транспортом фосфолипидов, метаболизмом ЖК (ацетил-КоА-карбоксилазы, десатуразы, ацилтрансферазы, лигазы длинноцепочечных ЖК) [21].

Briaud et al., изучив композиционный состав экзосом *S. aureus* при трех температурных режимах, имитирующих разные этапы инфекционного процесса, выявили отличия как в протеомном репертуаре, так и в РНК-профиле и цитотоксическом потенциале. Уникальные белки, идентифицированные в экзосомах, полученных при 34°C (температура колонизации кожи / слизистой носа), в основном принадлежали к функциональной категории «клеточная стенка»: липопротеины, белки синтеза пептидогликанов, тейхоевых кислот. Специфические белки экзосом, секретируемых при 37°C, были представлены категорией «транспортные и связывающие белки», тогда как экзосомы, полученные при 40°C (температура при лихорадке) культивирования, были обогащены белками энергетического метаболизма и белками, связанными с вирулентностью. Температурный режим оказывал влияние на состав, функцию и локализацию молекул РНК в экзо-

Таблица 1. **Факторы вирулентности, инкапсулированные в экзосомах микроорганизмов при термическом стрессе**
*Table 1. **Virulence factors encapsulated in exosomes of microorganisms under thermal stress***

№	Микроорганизм / *Microorganism*	Факторы вирулентности / *Virulence factors*		Источник / *Reference*
		37°C	42°C	
1	*Bacillus anthracis*	Летальный фактор LF, фактор отека EF, антролизин O, молекулярные шапероны / *Lethal factor LF, edema factor EF, anthrolysin O, molecular chaperones*	Нет данных / *No data*	[6]
2	*Yersinia pestis*	Капсульный антиген Caf1, мышиный токсин, адгезин Ail, каталитически активная протеаза Pla, pH 6-антиген, пестицин, белки защиты от кислотного, окислительного, температурного стрессов / *Capsular antigen Caf1, mouse toxin, adhesin Ail, catalytically active protease Pla, pH 6 antigen, pesticin, proteins protecting against acid, oxidative, and temperature stress*	Нет данных / *No data*	[31]
3	*Leptospira interrogans*	Альгинатная эпимераза AlgE, адгезины Lig A-C, белки LIC10419, LIC20153, участвующие в ответе на генотоксический стресс и стресс клеточной оболочки, moonlighting-белок TesA, нитрилредуктаза (ключевой фермент в биосинтезе кьюозина QueF) / *Alginate epimerase AlgE, adhesins Lig A-C, proteins LIC10419, LIC20153, involved in the response to genotoxic stress and cell wall stress, "moonlighting" protein TesA, nitrile reductase (key enzyme in the biosynthesis of queosin QueF)*	Нет данных / *No data*	[33]
4	*Campylobacter jejuni*	Адгезины, порообразующие и фибронектинсвязывающие белки, цитолетальный токсин CDTS, сериновая протеаза HtrA, ферменты фумаратного типа дыхания / *Adhesins, pore-forming and fibronectin-binding proteins, cytolethal toxin CDTS, serine protease HtrA, fumarate-type respiration enzymes*	Адгезины, флагеллины, сериновые протеазы HtrA, Cj0511, Cj1365c / *Adhesins, flagellins, serine proteases HtrA, Cj0511, Cj1365c*	[34]
5	*Francisella tularensis*	Фактор элонгации Tu, молекулярные шапероны, белки-эффекторы T6SS PdpA, PdpC / *Elongation factor Tu, molecular chaperones, T6SS effector proteins PdpA, PdpC*	Молекулярные шапероны, пероксидаза, хитиназы, кислые фосфатазы, метионинсульфоредуктазы A и B / *Molecular chaperones, peroxidase, chitinases, acid phosphatases, methionine sulforeductases A and B*	[21]
6	*Staphylococcus aureus*	Малые РНК RNAIII, RsaC, RsaOT, SAUSA300s005 и SAUSA300s003, кодирующие факторы вирулентности / *Small RNAs RNAIII, RsaC, RsaOT, SAUSA300s005 and SAUSA300s003 encoding virulence factors*	Гемолизины Hla и Hld, лейкотоксин Пантона-Валентайна LukF/S-PV, адгезин Ebh, коагулаза / *Hemolysins Hla and Hld, Panton-Valentine leukotoxin LukF/S-PV, adhesin Ebh, coagulase*	[29]

сомах *S. aureus*. РНК из экзосом, полученных при 34°C, были представлены мРНК, тРНК, малой РНК Teg49, локализованными на экзосомальной поверхности. При 37°C экзосомы транспортировали люминальные РНК: малые РНК, кодирующие факторы вирулентности (RNAIII, RsaC, RsaOT, SAUSA300s005 и SAUSA300s003). Увеличение температуры инкубации до 40°C резко снижало содержание в экзосомах РНК, большая часть которых была представлена рРНК. При 40°C (температура при лихорадке) продуцировались экзосомы, обладающие гемолитической активностью по отношению к эритроцитам человека и кролика, тогда как пониженная температура (34°C, температура колонизации кожи / слизистой носа) индуцировала образование экзосом, проявляющих цитотоксический эффект по отношению к макрофагам [29]. Авторы связывают выявленные отличия в специфике молекулярного груза и его локализации с альтернативными механизмами сортинга и биогенеза экзосом, осуществляемыми при разных температурных режимах.

Интересно, что молекулярные шапероны (GroEL, DnaK, ClpB), детектированные в составе экзосом при резкой смене температурного режима культивирования, не только участвуют в фолдинге и формировании четвертичной структуры белков в условиях стресса, но также могут выступать в роли адгезинов, инвазинов в процессе инфицирования макроорганизма.

Помимо факторов вирулентности, экзосомы бактериальных патогенов в условиях, имитирующих внутреннюю среду человека (физиологические значения температуры, pH и осмолярности), были обогащены белками метаболических путей: ферментами гликолиза, пентозофосфатного пути, метаболизма азотистых оснований, цикла Кребса, цикла β-окисления ЖК, синтеза фосфолипидов, снабжающими патогенов необходимыми веществами и поддерживающими оптимальный уровень гомеостаза в условиях враждебной среды хозяина. В то же время некоторые участники данных метаболических путей вовлечены в защиту микроорганизмов от летального воздействия экзогенных стрессоров (H_2O_2) а также служат факторами вирулентности (α-енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, транскетолаза) [31, 33].

Необходимо упомянуть тот факт, что экзосомы представляют собой одну из стратегий адаптации микроорганизмов к экотопам с экстремальными температурами, способствуя детоксикации, биоминерализации, утилизации высокомолекулярных субстратов и доставке веществ, недоступных для прямого поглощения бактериальной клеткой. Более того, экзосомы экстремофилов осуществляют докинг хромосомной, вирусной, плазмидной ДНК в клетки-реципиенты, защищая нуклеиновые кислоты не только от действия нуклеаз, но и от термоденатурации в гео- и гидротермальных средах, играя важную роль в эволюции и пластичности геномов, а также мобилома [35].

Таким образом, экзосомы, продуцируемые при температурном стрессе, способствуют адгезии, колонизации, инвазии и диссеминации патогенных микроорганизмов, обеспе-

чивают адаптацию к самым разнообразным, зачастую экстремальным условиям существования.

Осмотический стресс

Осмолярность среды по-разному оказывает влияние на везикуляцию микроорганизмов: у *Pseudomonas putida* высокая осмолярность увеличивала продукцию экзосом [36], у *S. aureus* гипотонические условия культивирования повышали уровень секреции экзосом [37], тогда как у *Vibrio vulnificus* выработка экзосом была максимальной при физиологической концентрации NaCl (0,9%) [38].

Экзосомы микроорганизмов, продуцируемые в условиях стресса, вызванного действием осмотических агентов (наночастиц, минеральных солей, органических веществ, растворенных газов), действуют как челноки для экспорта накопившихся в клетке продуктов перекисного окисления липидов, белков, а также липида А ЛПС, слабо связанного с поврежденной внешней мембраной. Экзосомы также смягчали токсичное воздействие осмотических агентов, связывая и секвестрируя, а также изменяя их коллоидную стабильность [39]. Более того, гипервезикуляция, наблюдаемая в условиях осмотического стресса, повышала гидрофобность клеточной поверхности, способствуя адгезии, агрегации клеток и биопленкообразованию [36, 39].

Осмотический стресс изменял протемный профиль экзосом в сторону белков, ассоциированных с мембраной: поринов, адгезинов, хеморецепторов, липопротеинов, металлосвязывающих белков: TonB-зависимых рецепторов, в т.ч. рецепторов гемина и сидерофоров, снабжающих клетки микроорганизмов микроэлементами, необходимыми для реализации их патогенетического потенциала и адаптации к стрессовым условиям [36, 40, 41]. Экзосомы уропатогенных бактерий, таких как *Proteus mirabilis*, *E. coli* (UPEC), секретируемые в условиях солевого стресса (искусственная урина), помимо вышеупомянутых белков, несли белки, связанные с подвижностью и колонизацией мочевыделительной системы (структурные компоненты фимбрий Mrp/P, PMF, FimH; жгутиков FilC) [41], а также принимали активное участие в транспорте порообразующих токсинов. 15 σB-зависимых белков были включены в состав экзосом *Listeria monocytogenes* при инкубации в условиях гиперосмоса, включая переносчик (Opu) L-карнитина, глицин-бетаина, холина, которые поддерживают тургорное давление клетки и стабилизируют структуру и функции ферментов во время стресса, способствуя выживанию патогена как в продуктах животного происхождения, так и в инфицированных клетках хозяина [40]. Лептоспиры в ответ на увеличение осмолярности среды секретировали экзосомы, обогащенные уникальными белками, связанными с хемотаксисом, сигналингом, синтезом аминокислот (цистеина, лизина, аспартата), бактериоцинов, клеточной стенки, РНК и др. Значительно возрастала экспрессия метаболических ферментов, таких как НАДН-оксидоредуктаза, транскетолаза и фосфоманномутаза [33].

Экзосомы патогенных грибов *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* и *Paracoccidioides brasiliensis*, выделенных из образцов урины и сыворотки больных, были обогащены липидными компонентами, в т.ч. заимствованными у хозяина: стероидами (эргостеролом и холестерином), которые придают экзосомальной мембране жесткость и устойчивость к физико-химическим факторам, метаболитами сфинголипидного пути (фитосфингозином и сфингозином), а также олеиновой кислотой, которая используется грибковыми патогенами в качестве источника углерода в фагосоме, обедненной питательными веществами. Кроме того, поглощение олеиновой кислоты хозяина увеличивает репликацию и скорость нелитического экзоцитоза C. neoformans, что может способствовать системному распространению патогена по механизму «троянского коня». Помимо липидов, экзосомы *C. Neoformans* содержали капсульный антиген глюкуроноксиломаннан, способствующий иммуносупрессии и анергии макрофагов [42].

Таким образом, экзосомы, продуцируемые в условиях осмотического стресса, повышали толерантность микроорганизмов к различным осмотическим агентам, позволяя колонизировать среды с широким диапазоном осмотического давления, включая биотопы хозяина.

pH-стресс

Скорость продукции и состав бактериальных везикул могут быть изменены флуктуациями pH. Подкисление среды способствовало увеличению скорости продукции экзосом как у экстрацеллюлярных, так и у факультативных, облигатных интрацеллюлярных микроорганизмов, включая *F. tularensis* [21], *Salmonella enterica* [43], *Streptococcus mutants* [44], а также паразитов *T. cruzi*, *Giardia intestinalis* [45]. Ощелачивание среды активировало процесс везикуляции у *Enterococcus faecalis* [46], *B. bronchiseptica* [27]. Стресс, индуцированный изменением pH, приводил не только к развитию гипервезикуляционного фенотипа, но и к морфологической трансформации экзосом: микро/макровезикулам и нитевидным TSMS [44, 47]. Многочисленные TSMS способствовали созданию консорциума биопленки на твердых неорганических субстратах, а гидрофобный фенотип гипервезикулирующих клеток обеспечивал им дополнительную устойчивость на стадии адгезии [47].

Масс-спектрометрическая характеристика экзосом микроорганизмов позволила выделить основные группы белков, которые преимущественно аккумулировались при pH-стрессе (табл. 2).

У *S. enterica* серовар Typhimurium в условиях pH-стресса отмечено включение в состав экзосом многочисленных полноразмерных РНК, ассоциированных с белками. Большинство из них в той или иной степени связаны с вирулентностью и устойчивостью патогена к стрессам. Так, 10Sa тмРНК участвует в регуляции генов *ivi*, связанных с вирулентностью (*vacB*, *f304*, *dedE*), и может способствовать устойчивости к окислительному стрессу, возникающему во время инфекции, предотвращая накопление аномальных белков, которые могут быть токсичными для клетки. Другим интересным компонентом является 6S некодирующая РНК (*SsrS*) которая, как было показано, играет ключевую роль в устойчивости и адаптации к экстремально кислой среде, с которой патогены сталкиваются во время инвазии эпителиальных клеток [50].

Экзосомы микроорганизмов, продуцируемые при разных значениях pH, обладали различными функциональными возможностями. Так, клетки *H. pylori* при культивировании в кислых условиях (pH 5,3) продуцировали микровези-

Таблица 2. **Основные группы белков, аккумулируемые в экзосомах при pH-стрессе**
*Table 2. **Main groups of proteins accumulated in exosomes under pH stress***

№	Белки / *Proteins*	Микроорганизм / *Microorganism*	Функция / *Function*	Источник / *Reference*
1	Молекулярные шапероны / *Molecular chaperones*	*F. tularensis, S. enterica, S. mutans, P. aeruginosa, G. vaginalis*	Стабилизация структуры ДНК, белков и защита их от денатурации в кислой/щелочной среде / *Stabilization of the structure of DNA and proteins and protection from denaturation in acidic/alkaline environments*	[21, 43, 44, 47, 48]
2	Фолдазы / *Foldases*	*E. faecalis, P. aeruginosa, G. vaginalis*	Рефолдинг «белков-клиентов» по окончании действия стресса / *Refolding of "client proteins" after stress*	[46–48]
3	Moonlighting-белки (гликолиза, глиоксилатного цикла, некоторые шапероны) / *Moonlighting proteins (glycolysis, glyoxylate cycle, some chaperones)*	*S. enterica, S. mutans, E. faecalis, G. vaginalis*	Участие во взаимодействии с клетками хозяина, адгезии и инвазии. Экономия ресурсов клетки в условиях сублетальных стрессов, направленных на производство отдельных узкоспецифичных белков / *Participation in interactions with host cells, adhesion, and invasion. Conservation of cellular resources under sublethal stress conditions, aimed at the production of individual, highly specific proteins.*	[43, 44, 46, 48]
4	ABC-транспортеры / *ABC transporters*	*S. enterica, S. mutans*	Снабжение микроорганизмов необходимыми питательными веществами и поддержка гомеостаза в условиях стресса / *Providing microorganisms with essential nutrients and maintaining homeostasis under stress conditions*	[43, 44]
5	Эффекторы T3SS, T4SS, T5SS *Effectors T3SS, T4SS, T5SS*	*S. enterica, S. mutans, F. nucleatum*	Участие в инвазии, миграции и формировании уникальных репликативных ниш микроорганизмов в организме хозяина / *Participation in invasion, migration and formation of unique replicative niches of microorganisms in the host organism*	[43, 44, 49]
6	Адгезины / *Adhesins*	*F. tularensis, S. enterica, S. mutans, P. aeruginosa, E. faecalis, G. vaginalis, F. nucleatum, H. pylori*	Участие в биопленкообразовании и колонизации биотопов хозяина / *Participation in biofilm formation and colonization of host biotopes*	[21, 43, 44, 46–51]

кулы, которые были обогащены белками адгезии к эпителиальным клеткам хозяина (HomA и GmhA), хеморецепторами (TlpC), что позволяет предположить их роль в колонизации слизистой оболочки желудка, тогда как OMV, полученные при нейтральном pH, были обогащены VacA (вакуолизирующий цитотоксин A), HcpA-E (β-лактамазы), MtrC (белок слияния), FrpB, NccB (белки, отвечающие за устойчивость к металлам и их транспортировку), что указывает на их потенциальную роль в патогенезе [51]. У *S. mutants* кислая среда индуцировала продукцию микровезикул, обогащенных антистрессовыми компонентами: адгезинами (SpaP, GbpS), белками углеводного и энергетического метаболизма, синтеза длинноцепочечных ненасыщенных ЖК, которые являются первой линией защиты стрептококков от кислотного стресса, а также лизоцимами (мурамидазами), которые участвуют в ремоделировании клеточной стенки, делении, биопленкообразовании, а также фратрициде. Сравнительный метаболомный анализ экзосом показал, что спектр многих метаболитов изменялся под воздействием кислотного стресса: экспрессия 25 метаболитов повышалась, а 12 метаболитов – понижалась. Некоторые из экспрессируемых метаболитов (L-карнитин, бетаин, трегалоза) являлись стрессопротекторами, смягчающими негативное воздействие окислительного, осмотического, температурного стрессов [52]. Макровезикулы *S. mutants* (≥1000 нм) секретируемые при щелочных значениях pH, обладали мощным кариесогенным потенциалом, транспортируя белки, участвующие в образовании матрикса кариесогенной биопленки (Gtfs, DexA), деструктивных изменений в дентине (LHD). Щелочной стресс способствовал инкапсуляции в экзосомах фрагментов ДНК, которые усиливают локальный синтез глюканов, повышают прочность внеклеточного матрикса, способствуя образованию высококогезивных биопленок. Интересно, что макровезикулы *S. mutants*, обогащенные глюкозилтрансферазами (Gtfs), оказывали влияние на формирование биопленки сопутствующей оральной микрофлорой, стимулируя (*C. albicans*) или подавляя данный процесс (*Streptococcus gordonii* и *Streptococcus sanguinis*) [53]. Обнаруженный факт указывает на важную роль экзосом, продуцируемых под влиянием стресса, не только в патогенезе, но и в межвидовых взаимодействиях. Аналогично экзосомы *Vibrio fischeri*, индуцированные действием pH-стресса в процессе транслокации микроорганизма из резервуара окружающей среды в ткани хозяина, являлись мощными стимуляторами установления симбиотических связей с организмом хозяина [54]. Экзосомы *E. faecalis*, продуцируемые при щелочном и нейтральном pH, отличались не только патогенетическим потенциалом, но и иммуномодулирующим эффектом. Экзосомы, секретируемые при щелочном стрессе, были обогащены белками вирулентности: сериновой протеазой SprE, кокколиназой GelE (участвуют в инвазии и транслокации патогена), LTA-синтазами (активируют каспазу-1, секрецию IL-1β), и вызывали более сильный воспалительный ответ *in vivo* [55]. Анализ цитокинов в сыворотке крови мышей показал, что экзосомы *E. faecalis*, образованные при щелочном стрессе (pH 9,0), стимулировали секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-1β (IL-1β), IL-6, фактора некроза опухоли-α (TNF-α), а также увеличивали процентное содержание клеток-супрессоров миелоидного происхождения, нейтрофилов, классических моноцитов и натуральных киллеров в селезенке, тогда как экзосомы, полученные при нейтральном pH, стимулировали увеличение IL-1β и моноцитов [46].

Таким образом, экзосомы, продуцируемые в условиях pH-стресса, были обогащены белками и метаболитами, обладающими свойствами ацидо/алкилопротекторов, способствуя персистенции микроорганизмов как в окружающей среде, так и в организме хозяина.

Токсический стресс

Токсический стресс, вызванный высокими концентрациями тяжелых металлов, органических веществ, применением антибактериальных препаратов (АБП), также приводит к мембранному блеббингу, который часто сопровождается развитием фенотипа гипервезикуляции у микроорганизмов. Экзосомы бактерий в данном случае представляют альтернативный механизм устойчивости к сублетальным концентрациям токсикантов (рис. 2).

Так, бактерии *P. putida* при помощи везикуляции удаляли молекулы TTAB (катионного сурфактанта), адсорбирующиеся на клеточной поверхности, защищая липидный бислой от деформации и разрушения [56]. Экзосомы, образованные *H. pylori* [57], *Stenotrophomonas* sp. [58] в условиях металлического стресса, были обогащены металлошаперонами, белками, участвующими в переносе и связывании металлов, металлопротеидами, а также ферментами метаболических путей: цикла Кребса, метаболизма глутатиона, биосинтеза аминокислот. *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Heamophilus influenza* и другие бактерии упаковывали β-лактамазы, цефалоспориназы, карбопенемазы в экзосомы для инактивации β-лактамных антибиотиков [59]. Интересно, что эти экзосомы оказывали протективный эффект в отношении не только штаммов-продуцентов, но и сосуществующих лактамаз-чувствительных бактерий. Воздействие антимикробных пептидов изменяло гидродинамический диаметр экзосом, дзета-потенциал, протеомный, липидомный, ДНК- и РНК-профили, а также увеличивало цитотоксичность по отношению к эукариотическим клеткам-мишеням. Так, помимо карбапенемаз, экзосомы *Acinetobacter baumannii* были обогащены: пептидогликангидролазами, сериновыми протеазами, омптинами, компонентами Bam-комплекса, изомеразами, шаперонами. Обработка АБП *K. pneumoniae* приводила к модификациям как протеомного, так и липидного состава экзосом относительно экзосом, образованных при стандартных условиях, причем эффект зависел от фенотипа штамма. У полимиксин-устойчивых штаммов в экзосомах экспрессировались белки биосинтеза ЛПС, деградации РНК и эксцизионной репарации нуклеотидов. Параллельно наблюдалось увеличение в содержании глицерофосфолипидов, ЖК, лизофосфолипидов и сфинголипидов, липида А, стабилизирующих экзосомную мембрану и защищающих молекулярный груз от деструкции. Сфинголипиды и лизофосфолипиды, встроенные в мембраны экзосом, часто принимают участие в сигналинге, активации иммунной системы хозяина. У полимиксин-чувствительных штаммов выявлено снижение экспрессии белков, связанных с адгезией, вирулентностью и стрессовыми реакциями клеточной оболочки, а также всех групп липидов, экспрессируемых у устойчивых штаммов [60].

Клетки *Acholeplasma laidlawii*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* и *H. pylori*, стрессированные обработкой АБП, помимо белков наружной мембраны, включали в состав экзосом различные типы РНК: тРНК (для Met, Asp, Leu, Tyr, Ser, Thr, Gly и Phe), малые РНК (6S RNA, SsrA, RsaC и RNAIII), участвующие в распознавании кворума, адаптации, вирулентности и персистенции [61]. Более того, бактериальные тРНК, инкапсулированные в экзосомы, могут доставляться в эукариотические клетки, модулируя иммунный ответ, экспрессию генов и пролиферацию клеток-хозяев.

Интересно, что под действием разных АБП один и тот же штамм может продуцировать экзосомы с разными характеристиками. Так, экзосомы *Mycobacterium tuberculosis*, образующиеся под воздействием этамбутола, были обогащены белками метаболизма ЖК, органических кислот, биосинтеза карбоновых кислот. Экзосомы, полученные при обработке клеток рифампицином и NZX (производное плектазина), были обогащены белками катаболизма макромолекул клеточной стенки и неполярными липидами (мономиколатом трегалозы). Экзосомы, полученные под действием изониа-

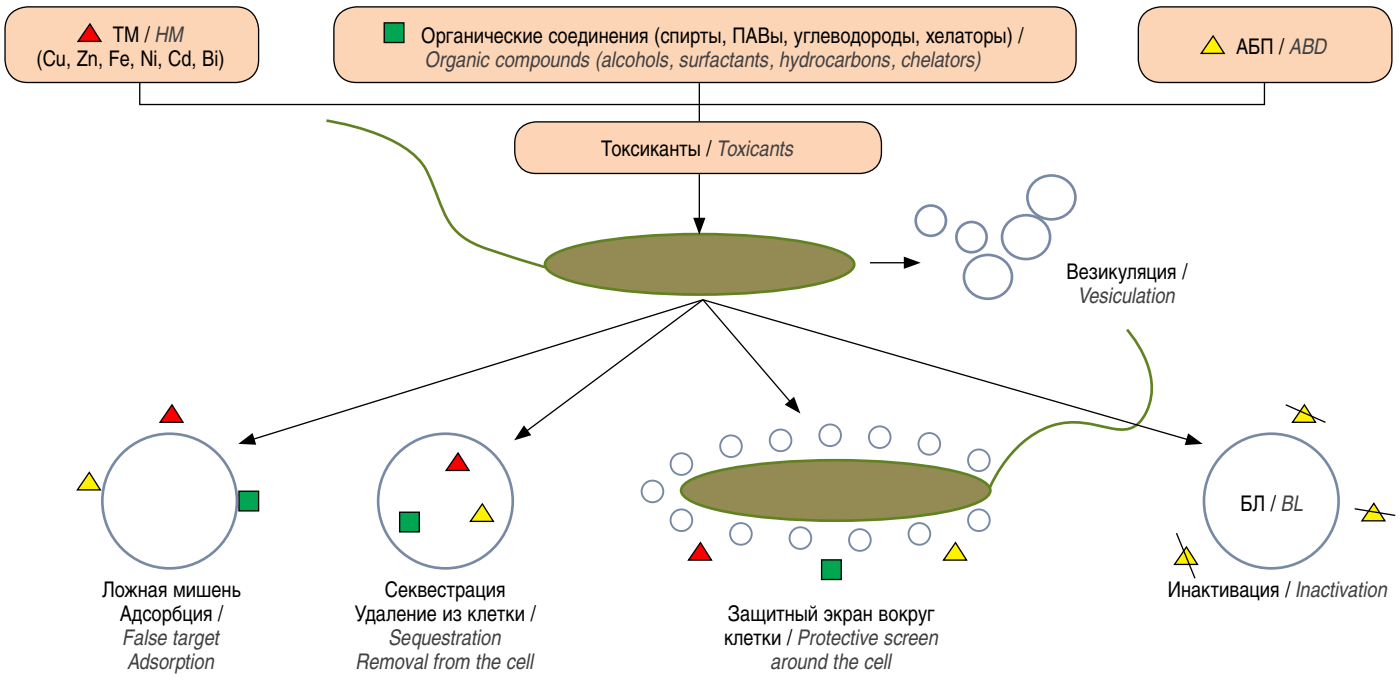


Рис. 2. **Роль везикуляции в адаптации микроорганизмов к токсическому стрессу. БЛ – β-лактамазы.**
Fig. 2. ***The role of vesiculation in the adaptation of microorganisms to toxic stress. BL – β-lactamases.***

зида, обладали высокой цитотоксичностью по отношению к моноцитарным клеткам. Экзосомы микобактерий, индуцированные действием разных АБП, отличались также иммуномодулирующим эффектом: экзосомы, полученные при обработке клеток изониазидом, стимулировали выработку цитокинов IL-1α, IL-8, CXCL10 и IL1RA, этамбутолом – TNF-α и IL-10, а NZX вызывал самый высокий уровень продукции IL-1α, IL-6, GM-CSF, IL-10 и IL1RA [62].

Таким образом, экзосомы, продуцируемые в условиях токсического стресса, транспортировали компоненты, связывающие либо инактивирующие токсиканты, снижая тем самым их концентрацию в среде и защищая клетки микроорганизмов от деформации и разрушения.

Дефицит питательных веществ

В условиях культивирования на минимальной питательной среде многие микроорганизмы активизируют продукцию экзосом, причем состав груза меняется в зависимости от типа голодания (табл. 3).

В условиях дефицита железа ряд микроорганизмов продуцируют экзосомы, обогащенные липофильными хелаторами железа – сидерофорами, которые могут служить донорами железа и поддерживать репликацию патогена в организме хозяина [10]. Также экзосомы могут нести на своей поверхности рецепторы катехолатных, гидроксаматных, смешанных и других типов сидерофоров, связывающие и переносящие хелатное железо внутрь экзосом [27]. Микроорганизмы также способны получать железо непосредственно из белков хозяина, связывающих железо: трансферрина, лактоферрина, гемина и гемоглобина, продуцируя экзосомы, обогащенные белками, участвующими в связывании и транспорте железа [10, 41]. *Corynebacterium glutamicum*, не имея собственных сидерофоров и белков, участвующих в связывании и транспорте железа, восполняет дефицит в этом микроэлементе, продуцируя экзосомы, обогащенные эфирами кориномиколовой кислоты и кислыми фосфолипидами, которые связывают, накапливают и доставляют железо бактериальным клеткам-продуцентам [68].

Впервые показано, что дефицит фосфора в среде являлся пусковым механизмом для продукции экзосом *Bacillus pumilus* 3-19, обогащенных РНКазой биназой – ферментом,

Таблица 3. **Влияние дефицита питательных веществ на молекулярный груз экзосом микроорганизмов**
*Table 3. **Influence of nutrient deficiency on the molecular weight of microorganism-derived exosomes***

Дефицит питательных веществ / *Nutrient deficiency*	Молекулярная нагрузка / *Molecular load*	Микроорганизм / *Microorganism*	Источник / *Reference*
Микроэлементы / *Microelements*			
Mn	Белки-переносчики марганца / *Manganese transport proteins*	*Prochlorococcus marinus*	[63]
Zn	Цинк-связывающий белок / *Zinc-binding protein*	*Bordetella spp.*	[27]
Макроэлементы / *Macronutrients*			
C	Эффекторы T3SS, T4SS, полная система синтеза фитотоксина коронатина, компоненты шикиматного пути / *Effectors of T3SS, T4SS, the complete synthesis system of the phytotoxin coronatin, components of the shikimate pathway*	*Pseudomonas syringae*	[64]
	Фрагменты тРНК / tRNA fragments	*Plasmodium falciparum*	[65]
N	Белки-переносчики аммония / *Ammonium transport proteins*	*Prochlorococcus marinus*	[63]
P	Белки биосинтеза и метаболизма липидов, аминокислот, гликозидов; РНКаза биназа / *Proteins of biosynthesis and metabolism of lipids, amino acids, glycosides; RNase binase*	*Bacillus pumilus*	[66]
S	Фосфотидилсерин / *Phosphatidylserine*	*Neisseria meningitidis*	[67]
	Белки-переносчики сульфатов / *Sulfate transport proteins*	*Prochlorococcus marinus*	[63]
Fe	Сидерофоры / *Siderophores*	*M. tuberculosis, Acinetobacter baumannii*	[10]
	Рецепторы сидерофоров / *Siderophore receptors*	*Bordetella spp., Neisseria meningitides, Mycobacterium tuberculosis, Acinetobacter baumannii*	[10, 27, 67]
	Гликолипиды и кислые фосфолипиды / *Glycolipids and acidic phospholipids*	*Corynebacterium glutamicum*	[68]
	Белки, участвующие в связывании и транспорте железа: бактериоферритин, флавинзависимая оксидоредуктаза, TonB-зависимые рецепторы и ABC-транспортеры / *Proteins involved in iron binding and transport: bacterioferritin, flavin-dependent oxidoreductase, TonB-dependent receptors, and ABC transporters*	*Neisseria gonorrhoeae, L. monocytogenes, P. aeruginosa, Bordetella spp., Porphyromonas gingivalis, Proteus mirabilis, M. tuberculosis, Prochlorococcus marinus*	[10, 27, 40, 41, 63]
Mg	Белки-переносчики магния / *Magnesium transport proteins*	*Prochlorococcus marinus*	[63]
Аминокислоты / *Amino acids*			
Цистеин / *Cysteine*	Фосфотидилсерин / *Phosphotidylserine*	*Neisseria meningitides*	[68]
Метионин, аргинин, гистидин / *Methionine, arginine, histidine*	Фрагменты тРНК / *tRNA fragments*	*Plasmodium falciparum, Trypanosoma cruzi*	[65]

обладающим выраженными цитотоксическими и онколитическими свойствами [66].

Фитопатоген *P. syringae* в условиях роста на минимальной питательной среде, имитирующей апопласт листьев, продуцировали экзосомы (OMV и O-IMV), обогащенные факторами патогенности: многочисленными эффекторами системы секреции III типа (Hop-белки) для подавления защиты организма-хозяина, белками системы секреции IV типа (включая PilF-Q) [64]. Особый интерес представляет обнаружение в составе экзосом, полученных в стрессовых условиях, полной системы синтеза фитотоксина коронатина (аналога жасмонатов), компонентов шикиматного пути, которые могут играть роль белков-эффекторов, меняющих метаболический статус клеток-хозяина посредством метаболического прайминга.

Недостаток аминокислот в питательной среде являлся триггером активации процессов везикуляции: OMV, O-IMV, MV, TSMS у *Francisella novicida*, *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4, *Neisseria meningitidis* (цистеин), а также у некоторых паразитов [65, 68]. Примечательно, что экзосомы паразитов в условиях дефицита питательных веществ были обогащены фрагментами тРНК. Фрагментарные тРНК опосредованно участвуют в реакциях паразитов на стрессы и в посттранскрипционной регуляции. Более того, было показано, что экзосомы паразитов могут доставлять РНК-грузы в клетки-мишени человека посредством рафт-зависимого эндоцитоза и модулировать экспрессию генов хозяина, способствуя выживанию и адаптации паразита в организме хозяина [68].

Стресс, вызванный дефицитом питательных веществ, может вовлекать микроорганизмы во внутри-/межвидовую конкурентную борьбу, в которой ключевую роль играют экзосомы, транспортирующие соединения, угнетающие, повреждающие либо уничтожающие конкурентов: гидролитические ферменты, бактериоцины, антибиотики, токсины. Так, молочнокислые бактерии *Ligilactobacillus* spp. из слизистой оболочки кишечника домашней птицы продуцировали экзосомы, обогащенные пептидогликан-связывающими/деградирующими белками, ABC-транспортерами, проявляя выраженную антимикробную активность в отношении грамотрицательных энтеропатогенов, таких как *S. enterica* serovar Typhimurium и *Campylobacter jejuni* [69]. Экзосомы *E. coli* не только обладали бактериостатическим эффектом в отношении грамположительной микрофлоры (*S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus subtilis*), но и оказывали негативное воздействие на деление клеток, метаболизм и вирулентность. Предполагают, что аллелопатический эффект экзосом кишечной палочки был связан с транспортируемыми в их составе эффекторами, которые изменяли транскрипцию сотен генов конкурентов [70]. В то же время в ко-культурах экзосомы могут принимать участие во взаимовыгодном метаболическом кроссфидинге, снабжая членов сообщества необходимыми питательными веществами: сахарами, аминокислотами, витаминами, микроэлементами, органическими кислотами, нуклеозидтрифосфатами либо транспортируя энзимы (деполимеразы, гидролазы, оксидазы, кутилазы и др.), разлагающие сложные полимерные субстраты до более коротких фрагментов: олигомеров, димеров и мономеров, доступных для поглощения всеми членами микробного сообщества. Более того, исследования последних лет показали, что межвидовые взаимодействия микроорганизмов могут служить физиологическими триггерами, активирующими «спящие» кластеры биосинтетических генов, приводя к синтезу и выделению в окружающую среду новых биологически активных веществ. Так, сокультивирование актиномицетов с микобактериями индуцировало продукцию широкого спектра экзометаболитов, отличающихся по своей химической структуре, активности и путям синтеза: хинонов (антрациклины), поликетидов (стрептоаминалы, тетрагидрохинолины), полиеновых макролактамов, циклических пептидов, обладающих бактерицидным, фунгицидным, противовирусным и инсектицидным действиями [71]. Некоторые из продуцируемых метаболитов, такие как индолокарбазолы, проявляли свойства мощных ингибиторов киназ и ДНК-топоизомераз I, что делает их перспективными кандидатами для использования в противоопухолевой терапии. Большая часть продуцируемых биологически активных веществ была ассоциирована с экзосомами, которые осуществляли прямую доставку груза микроорганизмам-конкурентам посредством слияния мембран.

Таким образом, экзосомы, полученные в условиях дефицита питательных веществ, были обогащены компонентами, связывающими и доставляющими клеткам-продуцентам необходимые соединения, в т.ч. заимствованные у организма-хозяина. Некоторые компоненты молекулярного груза оказывали аллелопатический эффект в отношении бактериальных ассоциантов.

Заключение

Анализ литературных данных убедительно свидетельствует о вариативности молекулярного груза экзосом в процессе адаптации/персистенции микроорганизмов к различным видам стресса: оксидативному, температурному, осмотическому, pH-, токсическому и стрессу, вызванному дефицитом питательных веществ. Управляя спецификой «молекулярного груза» экзосом, микроорганизмы задействуют данные внеклеточные структуры в качестве медиаторов в различных аспектах своей жизнедеятельности: установлении межклеточных контактов (симбиоза, комменсализма и паразитизма), репрограммировании клеток-мишеней, везидукции, биопленкообразовании, формировании толерантности к тем или иным стрессирующим факторам, а также поддержании фитнеса. Ремоделирование дизайна экзосомальной антигенной структуры под действием стрессоров меняет иммуногенность экзосом, что может быть использовано при конструировании современных вакцин с целью повышения терапевтической эффективности препаратов на основе экзосом. Под действием экологических стрессов могут активироваться скрытые пути метаболизма, приводя к синтезу соединений с уникальными свойствами, которые могут транспортироваться в составе экзосом. Более того, возможно, сами экзосомы микроорганизмов, полученные в условиях тех или иных стрессов, могут выступать как триггеры активации underground-метаболизма, что в перспективе позволит не только выявить скрытый биосинтетический потенциал микроорганизмов, но и получить новые сведения об экологической роли тех или иных соединений в физиологии микроорганизмов.

В связи с этим актуальным является изучение композиционного состава экзосом с позиции их роли в реализации адаптационного/персистентного, патогенетического, биосинтетического потенциала в условиях различных экологических стрессов, а также с целью совершенствования специфической профилактики инфекционных болезней.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Funding

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Kulkarni HM, Jagannadham MV. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. Microbiology (Reading). 2014 Oct;160(Pt 10):2109-2121. DOI: 10.1099/mic.0.079400-0
2. Baeza N, Delgado L, Comas J, Mercade E. Phage-Mediated Explosive Cell Lysis Induces the Formation of a Different Type of O-IMV in *Shewanella vesiculosa* M7T. Front Microbiol. 2021 Oct 8;12:713669. DOI: 10.3389/fmicb.2021.713669
3. Alaei SR, King AJ, Banani K, Reddy A, Ortiz J, Knight AL, et al. Lipid a remodeling modulates outer membrane vesicle biogenesis by *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol. 2025 Jan 31;207(1):e0033624. DOI: 10.1128/jb.00336-24
4. Nagakubo T, Nomura N, Toyofuku M. Cracking Open Bacterial Membrane Vesicles. Front Microbiol. 2020 Jan 17;10:3026. DOI: 10.3389/fmicb.2019.03026
5. Naradasu D, Miran W, Sharma S, Takenawa S, Soma T, Nomura N, et al. Biogenesis of Outer Membrane Vesicles Concentrates the Unsaturated Fatty Acid of Phosphatidylinositol in *Capnocytophaga ochracea*. Front Microbiol. 2021 May 21;12:682685. DOI: 10.3389/fmicb.2021.682685
6. Gan Y, Zhao G, Wang Z, Zhang X, Wu MX, Lu M. Bacterial Membrane Vesicles: Physiological Roles, Infection Immunology, and Applications. Adv Sci (Weinh). 2023 Sep;10(25):e2301357. DOI: 10.1002/advs.202301357
7. Tashiro Y, Inagaki A, Shimizu M, Ichikawa S, Takaya N, Nakajima-Kambe T, et al. Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(3):605-7. DOI: 10.1271/bbb.100754
8. Warda M, Tekin S, Gamal M, Khafaga N, Çelebi F, Tarantino G. Lipid rafts: novel therapeutic targets for metabolic, neurodegenerative, oncological, and cardiovascular diseases. Lipids Health Dis. 2025 Apr 17;24(1):147. DOI: 10.1186/s12944-025-02563-0
9. Xue K, Wang L, Liu J. Bacterial outer membrane vesicles and their functionalization as vehicles for bioimaging, diagnosis and therapy. Mater. Adv. 2022 Oct 8; 3:7185-97. DOI: 10.1039/d2ma00420h
10. Prados-Rosales R, Weinrick BC, Piqué DG, Jacobs WR Jr, Casadevall A, Rodriguez GM. Role for *Mycobacterium tuberculosis* membrane vesicles in iron acquisition. J Bacteriol. 2014 Mar;196(6):1250-6. DOI: 10.1128/JB.01090-13
11. Meyer KJ, Nodwell JR. Streptomyces extracellular vesicles are a broad and permissive antimicrobial packaging and delivery system. J Bacteriol. 2024 Mar 21;206(3):e0032523. DOI: 10.1128/jb.00325-23
12. Ichikawa S, Tsuge Y, Karita S. Metabolome Analysis of Constituents in Membrane Vesicles for *Clostridium thermocellum* Growth Stimulation. Microorganisms. 2021 Mar 13;9(3):593. DOI: 10.3390/microorganisms9030593
13. Woznica A, Cantley AM, Beemelmanns C, Freinkman E, Clardy J, King N. Bacterial lipids activate, synergize, and inhibit a developmental switch in choanoflagellates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 12;113(28):7894-9. DOI: 10.1073/pnas.1605015113
14. Zakharzhevskaya NB, Vanyushkina AA, Altukhov IA, Shavarda AL, Butenko IO, Rakitina DV, et al. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities. Sci Rep. 2017 Jul 10;7(1):5008. DOI: 10.1038/s41598-017-05264-6
15. Rodriguez BV, Kuehn MJ. *Staphylococcus aureus* secretes immunomodulatory RNA and DNA via membrane vesicles. Sci Rep. 2020 Oct 26; 10(1):18293. DOI: 10.1038/s41598-020-75108-3
16. Xiu L, Wu Y, Lin G, Zhang Y, Huang L. Bacterial membrane vesicles: orchestrators of interkingdom interactions in microbial communities for environmental adaptation and pathogenic dynamics. Front Immunol. 2024 Mar 21;15:1371317. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1371317
17. Zhang F, Zhou Y, Ding J. The current landscape of microRNAs (miRNAs) in bacterial pneumonia: opportunities and challenges. Cell Mol Biol Lett. 2022 Aug 19;27(1):70. DOI: 10.1186/s11658-022-00368-y
18. Lekmeechai S, Su YC, Brant M, Alvarado-Kristensson M, Vallström A, Obi I, et al. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles Protect the Pathogen From Reactive Oxygen Species of the Respiratory Burst. Front Microbiol. 2018 Sep 7;9:1837. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01837
19. Wawrzeniak K, Gaur G, Sapi E, Senejani AG. Effect of *Borrelia burgdorferi* Outer Membrane Vesicles on Host Oxidative Stress Response. Antibiotics (Basel). 2020 May 25;9(5):275. DOI: 10.3390/antibiotics9050275
20. Chiplunkar SS, Silva CA, Bermudez LE, Danelishvili L. Characterization of membrane vesicles released by *Mycobacterium avium* in response to environment

mimicking the macrophage phagosome. Future Microbiol. 2019 Mar;14(4):293-313. DOI: 10.2217/fmb-2018-0249

21. Klimentova J, Pavkova I, Horcickova L, Bavlovic J, Kofronova O, Benada O, et al. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Releases Differentially Loaded Outer Membrane Vesicles Under Various Stress Conditions. Front Microbiol. 2019 Oct 10;10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304
22. Bozhokina ES, Berson YM. Role of Outer Membrane Vesicles in *Serratia grimesii* Interactions with Caco-2 Cells. Cell Tiss. Biol. 2021;15:473-481. DOI: 10.1134/S1990519X21050023
23. Toyofuku M, Zhou S, Sawada I, Takaya N, Uchiyama H, Nomura N. Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Environ Microbiol. 2014 Sep;16(9):2927-38. DOI: 10.1111/1462-2920.12260
24. Li C, Wei Z, He X, He H, Liu Y, Zuo Y, et al. OxyR-regulated T6SS functions in coordination with siderophore to resist oxidative stress. Microbiol Spectr. 2024 Feb 6;12(2):e0323123. DOI: 10.1128/spectrum.03231-23
25. Orench-Rivera N, Kuehn MJ. Differential Packaging Into Outer Membrane Vesicles Upon Oxidative Stress Reveals a General Mechanism for Cargo Selectivity. Front Microbiol. 2021 Jul 2;12:561863. DOI: 10.3389/fmicb.2021.561863
26. Schwechheimer C, Rodriguez DL, Kuehn MJ. NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. Microbiologyopen. 2015 Jun;4(3):375-89. DOI: 10.1002/mbo3.244
27. de Jonge EF, Balhuizen MD, van Boxtel R, Wu J, Haagsman HP, Tommassen J. Heat shock enhances outer-membrane vesicle release in *Bordetella* spp. Curr Res Microb Sci. 2020 Sep 17;2:100009. DOI: 10.1016/j.crmicr.2020.100009
28. McMahon KJ, Castelli ME, García Vescovi E, Feldman MF. Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. J Bacteriol. 2012 Jun;194(12):3241-9. DOI: 10.1128/JB.00016-12
29. Briaud P, Frey A, Marino EC, Bastock RA, Zielinski RE, Wiemels RE, et al. Temperature Influences the Composition and Cytotoxicity of Extracellular Vesicles in *Staphylococcus aureus*. mSphere. 2021 Oct 27;6(5):e0067621. DOI: 10.1128/mSphere.00676-21
30. Ma G, Ding Y, Wu Q, Zhang J, Liu M, Wang Z, et al. Yersinia enterocolitica-Derived Outer Membrane Vesicles Inhibit Initial Stage of Biofilm Formation. Microorganisms. 2022 Nov 29;10(12):2357. DOI: 10.3390/microorganisms10122357
31. Eddy JL, Gielda LM, Caulfield AJ, Rangel SM, Lathem WW. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. PLoS One. 2014 Sep 8;9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002
32. Vasconcelos CI, Cronemberger-Andrade A, Souza-Melo N, Maricato JT, Xander P, Batista WL, et al. Stress Induces Release of Extracellular Vesicles by *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. J Immunol Res. 2021 Sep 23;2021:2939693. DOI: 10.1155/2021/2939693
33. Techawiwattanaboon T, Phanchamnan E, Iadsee N, Makjaroen J, Pisitkun T, Patarakul K. Proteomic profile of naturally released extracellular vesicles secreted from *Leptospira interrogans* serovar Pomona in response to temperature and osmotic stresses. Sci Rep. 2023 Oct 30;13(1):18601. DOI: 10.1038/s41598-023-45863-0
34. Taheri N, Fällman M, Wai SN, Fahlgren A. Accumulation of virulence-associated proteins in *Campylobacter jejuni* Outer Membrane Vesicles at human body temperature. J Proteomics. 2019 Mar 20;195:33-40. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.01.005
35. Liu J, Soler N, Gorlas A, Cvirkaite-Krupovic V, Krupovic M, Forterre P. Extracellular membrane vesicles and nanotubes in Archaea. Microlife. 2021 Jun 10;2:uqab007. DOI: 10.1093/femsml/uqab007
36. Baumgarten T, Sperling S, Seifert J, von Bergen M, Steiniger F, Wick LY, et al. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances Pseudomonas putida DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2012 Sep;78(17):6217-24. DOI: 10.1128/AEM.01525-12
37. Wang X, Koffi PF, English OF, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles: A Story of Toxicity and the Stress of 2020. Toxins (Basel). 2021 Jan 20;13(2):75. DOI: 10.3390/toxins13020075
38. Park JH, Song S, Kim S, Kim M, Kim KS. Optimizing Conditions for the Production of Bacterial Extracellular Vesicles of *Vibrio vulnificus* and Analysis of the Inner Small RNA Compositions. J Microbiol Biotechnol. 2024 Jan 28;34(1):29-38. DOI: 10.4014/jmb.2310.10002
39. Pagnout C, Razafitianamaharavo A, Sohm B, Caillet C, Beaussart A, Delatour E, et al. Osmotic stress and vesiculation as key mechanisms controlling bacterial sensitivity and resistance to TiO_2 nanoparticles. Commun Biol. 2021 Jun 3;4(1):678. DOI: 10.1038/s42003-021-02213-y
40. Lee T, Jun SH, Choi CW, Kim SI, Lee JC, Shin JH. Salt stress affects global protein expression profiles of extracellular membrane-derived vesicles of *Listeria monocytogenes*. Microb Pathog. 2018 Feb;115:272-279. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.071
41. González MJ, Navarro N, Cruz E, Sánchez S, Morales JO, Zunino P, et al. First report on the physicochemical and proteomic characterization of *Proteus mirabilis* outer membrane vesicles under urine-mimicking growth conditions: comparative analysis with *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2024 Nov 6;15:1493859. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1493859
42. Rezende CP, Santos PW, Piraine RA, Silvestrini VC, Barbosa JCJ, Valera FCP, et al. Extracellular vesicles produced during fungal infection in humans are immunologically active. 2024. Preprint at bioRxiv. DOI: 10.1101/2024.03.20.585987
43. Bai J, Kim SI, Ryu S, Yoon H. Identification and characterization of outer membrane vesicle-associated proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect Immun. 2014 Oct;82(10):4001-10. DOI: 10.1128/IAI.01416-13
44. Cao Y, Zhou Y, Chen D, Wu R, Guo L, Lin H. Proteomic and metabolic characterization of membrane vesicles derived from *Streptococcus mutans* at different pH values. Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Nov;104(22):9733-9748. DOI: 10.1007/s00253-020-10563-6
45. Olajide JS, Cai J. Perils and Promises of Pathogenic Protozoan Extracellular Vesicles. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Aug 14;10:371. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00371
46. Niu C, Huang J, Wei L, Wang J, Ran S. Proinflammatory Effect of Membrane Vesicles Derived from *Enterococcus faecalis* at Neutral and Alkaline pH. J Endod. 2024 Nov;50(11):1602-1611.e10. DOI: 10.1016/j.joen.2024.08.018
47. Ahmed F, Mirani ZA, Ahmed A, Urooj S, Khan FZ, Siddiqi A, et al. Nanotubes Formation in *P. aeruginosa*. Cells. 2022 Oct 26;11(21):3374. DOI: 10.3390/cells11213374
48. Shishpal P, Patel V, Singh D, Bhor VM. pH Stress Mediated Alteration in Protein Composition and Reduction in Cytotoxic Potential of Gardnerella vaginalis Membrane Vesicles. Front Microbiol. 2021 Nov 2;12:723909. DOI: 10.3389/fmicb.2021.723909
49. Zhang X, Wang Y, Fan R, Zhang L, Li Z, Zhang Y, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Outer Membrane Vesicles from Fusobacterium nucleatum Cultivated in the Mimic Cancer Environment. Microbiol Spectr. 2023 Aug 17;11(4):e0039423. DOI: 10.1128/spectrum.00394-23
50. Malabirade A, Habier J, Heintz-Buschart A, May P, Godet J, Halder R, et al. The RNA Complement of Outer Membrane Vesicles From *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Under Distinct Culture Conditions. Front Microbiol. 2018 Aug 30;9:2015. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02015
51. Johnston EL, Guy-Von Stieglitz S, Zavan L, Cross J, Greening DW, Hill AF, et al. The effect of altered pH growth conditions on the production, composition, and proteomes of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. Proteomics. 2024 Jun;24(11):e2300269. DOI: 10.1002/pmic.202300269
52. Iwabuchi Y, Nakamura T, Kusumoto Y, Nakao R, Iwamoto T, Shinozuka O, et al. Effects of pH on the Properties of Membrane Vesicles Including Glucosyltransferase in *Streptococcus mutans*. Microorganisms. 2021 Nov 6;9(11):2308. DOI: 10.3390/microorganisms9112308

53. Qiu L, Chen Q, Zheng G, Dong H, Xu M, Zhou J, et al. A brief review of membrane vesicles from *Streptococcus mutans*. Front Microbiol. 2025 Oct 10;16:1656926. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1656926
54. Aschtgen MS, Wetzel K, Goldman W, McFall-Ngai M, Ruby E. *Vibrio fischeri*-derived outer membrane vesicles trigger host development. Cell Microbiol. 2016 Apr;18(4):488-99. DOI: 10.1111/cmi.12525
55. Yuan Z, Huang W, Chan P, Zhou J, Liang J, Guo L. Membrane Vesicles of *Enterococcus faecalis: In Vitro* Composition Analysis and Macrophage Inflammatory Response Under Different pH Conditions. Microorganisms. 2025 Jun 10;13(6):1344. DOI: 10.3390/microorganisms13061344
56. Heredia RM, Boeris PS, Liffourrena AS, Bergero MF, López GA, Lucchesi GI. Release of outer membrane vesicles in *Pseudomonas putida* as a response to stress caused by cationic surfactants. Microbiology (Reading). 2016 May;162(5):813-822. DOI: 10.1099/mic.0.000265
57. Kumar S, Schmitt C, Gorgette O, Marbouty M, Duchateau M, Giai Gianetto Q, et al. Bacterial Membrane Vesicles as a Novel Strategy for Extrusion of Antimicrobial Bismuth Drug in *Helicobacter pylori*. mBio. 2022 Oct 26;13(5):e0163322. DOI: 10.1128/mbio.01633-22
58. Wang T, Yin Y, Zhang J, Guan H, Xu J, Liu X. Extracellular vesicles as a strategy for cadmium secretion in bacteria SH225. Chemosphere. 2023 May;324:138373. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.138373
59. Schaar V, Nordström T, Mörgelin M, Riesbeck K. Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles carry β-lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Aug;55(8):3845-53. DOI: 10.1128/AAC.01772-10
60. Jasim R, Han ML, Zhu Y, Hu X, Hussein MH, Lin YW, et al. Lipidomic Analysis of the Outer Membrane Vesicles from Paired Polymyxin-Susceptible and -Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. Int J Mol Sci. 2018 Aug 10;19(8):2356. DOI: 10.3390/ijms19082356
61. Joshi B, Singh B, Nadeem A, Askarian F, Wai SN, Johannessen M, et al. Transcriptome Profiling of *Staphylococcus aureus* Associated Extracellular Vesicles Reveals Presence of Small RNA-Cargo. Front Mol Biosci. 2021 Jan 13;7:566207. DOI: 10.3389/fmolb.2020.566207
62. Davids CJ, Umashankar-Rao K, Kassaliete J, Ahmadi S, Happonen L, Welinder C, et al. The role of antibiotic-derived mycobacterial vesicles in tuberculosis pathogenesis. Sci Rep. 2024 Nov 15;14(1):28198. DOI: 10.1038/s41598-024-79215-3
63. Fritts RK, McCully AL, McKinlay JB. Extracellular Metabolism Sets the Table for Microbial Cross-Feeding. Microbiol Mol Biol Rev. 2021;85(1):e00135-20. DOI: 10.1128/MMBR.00135-20
64. Janda M, Rybak K, Krassini L, Meng C, Feitosa-Junior O, Stigliano E, et al. Biophysical and proteomic analyses of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 extracellular vesicles suggest adaptive functions during plant infection. mBio. 2023 Aug 31;14(4):e0358922. DOI: 10.1128/mbio.03589-22
65. Sharma M, Singh U. Role of tRNA-Derived Fragments in Protozoan Parasite Biology. Cells. 2025 Jan 14;14(2):115. DOI: 10.3390/cells14020115
66. Kurdy W, Zelenikhin PV, Yakovleva GY, Sinyagina MN, Kolpakov AI, Ilinskaya ON. The Proteome of Extracellular Membrane Vesicles from *Bacillus pumilus* 3-19. Mol Biol (Mosk). 2024 Jan-Feb;58(1):178-186. DOI: 10.31857/S0026898424010186 (In Russian).
67. Gerritzen MJH, Maas RHW, van den Ijssel J, van Keulen L, Martens DE, Wijffels RH, et al. High dissolved oxygen tension triggers outer membrane vesicle formation by *Neisseria meningitidis*. Microb Cell Fact. 2018 Oct 3;17(1):157. DOI: 10.1186/s12934-018-1007-7
68. Kawashima K, Nagakubo T, Nomura N, Toyofuku M. Iron Delivery through Membrane Vesicles in *Corynebacterium glutamicum*. Microbiol Spectr. 2023 Jun 15;11(3):e0122223. DOI: 10.1128/spectrum.01222-23
69. Miri S, Mottawea W, Leao L, Chiba M, Li Y, Minic Z, et al. *Ligilactobacillus*-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Growth and Virulence of Enteric Pathogens. Probiotics Antimicrob Proteins. 2025 Aug;17(4):2244-2261. DOI: 10.1007/s12602-024-10423-z
70. Kawagishi Y, Murase K, Grebenshchikova A, Iibushi J, Ma C, Kimeu TM, et al. Bacterial extracellular vesicles target different bacterial species, impairing cell division and diminishing their pathogenicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 May 6;122(18):e2416652122. DOI: 10.1073/pnas.2416652122
71. Asamizu S. Co-cultivation strategies for natural product discovery from actinomycetes: unlocking silent secondary metabolism with mycolic acid-containing bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 2025 Jun 25;41(7):217. DOI: 10.1007/s11274-025-04406-7

Информация о соавторе:

Дуванова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1702-1620

Information about co-author:

Olga V. Duvanova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1702-1620

НОВОСТИ НАУКИ

Тест для диагностики устойчивости бактерий к антибиотикам



Ученые Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора разработали первый в мире зарегистрированный медицинский тест для диагностики устойчивости бактерий к антибиотикам группы бета-лактамов с помощью метода CRISPR/Cas. Тест предназначен для качественного анализа цереброспинальной жидкости на наличие гена *mecA*, что позволяет своевременно корректировать лечебную стратегию при инфекциях метициллин-устойчивыми бактериями. Разработка обладает высокой чувствительностью и достоверностью благодаря внедренному механизму двойной проверки избирательности.

Специалисты Роспотребнадзора разработали и зарегистрировали инновационный тест на основе технологии CRISPR/Cas для выявления гена устойчивости к метициллину. Микробиус [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://microbius.ru/news/spetsialisty-rospotrebnadzora-razrabotali-i-zaregistrirovali-innovatsionnyy-test-na-osnove-tehnologii-crispr-cas-dlya-vyyavleniya-gena-ustoychivosti-k-metitsillinu (дата обращения: 07.08.2026).

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-107-121

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 107–121
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 107–121

Возбудители газовой гангрены как раневой инфекции, факторы патогенности, угроза биологической безопасности и стратегии разработки вакцинных препаратов

Ю.О.Гончарова, В.С.Тимофеев, И.А.Дятлов

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

Представлены результаты анализа литературы о частоте случаев газовой гангрены как раневой инфекции в разные временные периоды, в особенности о заболеваемости и смертности от клостридиальных инфекций в военных конфликтах. Приведена историческая справка о изучении возбудителей газовой гангрены и специфике инфекционного процесса. Рассмотрены основные характеристики четырех видов *Clostridium* – *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii* и *C. novyi* – и структура и механизм действия их основных токсинов и факторов патогенности. Приведены данные о важности изучения этих видов и их токсинов с точки зрения биологической безопасности. Рассмотрены наиболее значимые примеры стратегий разработки вакцинных препаратов против газовой гангрены.
Ключевые слова: газовая гангрена, раневая инфекция, Clostridium, токсин, биологическая безопасность, вакцина

Для цитирования: Гончарова Ю.О., Тимофеев В.С., Дятлов И.А. Возбудители газовой гангрены как раневой инфекции, факторы патогенности, угроза биологической безопасности и стратегии разработки вакцинных препаратов. Бактериология. 2026; 11(3): 107–121. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-107-121

Causative agents of gas gangrene as a wound infection, pathogenicity factors, threat to biological safety, and strategies for the development of vaccine preparations

Yu.O.Goncharova, V.S.Timofeev, I.A.Dyatlov

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

The article presents the results of an analysis of the literature on the incidence of gas gangrene as a wound infection in different time periods, especially on the incidence and mortality from clostridial infections in military conflicts. The historical information on the study of the causative agents of gas gangrene and the specifics of the infectious process is given. The main characteristics of four species *Clostridium* – *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii* and *C. novyi*, as well as the structure and mechanism of action of their main toxins and pathogenicity factors – are considered. Data on the importance of studying these species and their toxins from the point of view of biological safety are presented. The most significant examples of strategies for the development of vaccines against gas gangrene are considered.
Key words: gas gangrene, wound infection, Clostridium, toxin, biological safety, vaccine

For citation: Goncharova Yu.O., Timofeev V.S., Dyatlov I.A. Causative agents of gas gangrene as a wound infection, pathogenicity factors, threat to biological safety, and strategies for the development of vaccine preparations. Bacteriology. 2026; 11(3): 107–121. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-107-121

Для корреспонденции:

Гончарова Юлия Олеговна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора»

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
ORCID: 0000-0003-1682-8788

Статья поступила 15.06.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Yulia O. Goncharova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Anthrax microbiology laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
ORCID: 0000-0003-1682-8788

The article was received 15.06.2026, accepted for publication 30.09.2026

Газовая гангрена – это высоколетальная некротизирующая инфекция скелетных мышц и подкожной клетчатки. В настоящее время заболеваемость газовой гангреной у людей низкая, но летальность остается достаточно высокой. При своевременной диагностике и соответствующем лечении, включая хирургическую помощь, антибиотикотерапию и гипербарическую оксигенотерапию, летальность колеблется от 5 до 30%, а при отсутствии лечения достигает 100%. Иногда для спасения жизни требуется ампутация пораженной конечности [1]. Раневые инфекции, вызываемые клостридиями, встречаются по всему миру, поскольку эти бактерии повсеместно распространены в почве и в нормальной микрофлоре человека и животных [2].

Цель данного обзора – обобщение и анализ информации о заболеваемости газовой гангреной как раневой инфекцией, ее значении для биологической безопасности, основных возбудителях и токсинах, а также перспективах разработки вакцинных препаратов.

Историческая справка и статистические данные

Газовая гангрена как заболевание, вызываемое заражением глубоких ран клостридиями, видимо, сопровождала человечество с глубокой древности. Однако, скорее всего, сколько-либо масштабную форму заболеваемость приобрела лишь во времена, когда развитие общества сделало возможными масштабные военные конфликты, неизбежно сопровождающиеся массовым получением ранений и, учитывая отсутствие медицины в современном понимании, массовыми случаями раневых инфекций. Условно эту границу можно провести по дате битвы на реке Толлензе (1250–1300 гг. до н.э.), как самого древнего из известных массовых военных конфликтов. Несмотря на то, что природа заболевания вплоть до XIX в. оставалась неизвестной, на основе эмпирического опыта постоянно предпринимались попытки увеличить частоту развития раневых инфекций у противника за счет загрязнения наконечников стрел землей как источником бактерий, в т.ч. *Clostridium perfringens* и *Clostridium tetani* (возбудитель столбняка) [3].

Несмотря на вероятную древность этой раневой инфекции, первое ее описание и выделение в отдельное заболевание (по крайней мере в Европе) зафиксировано лишь в Новое время и приписывается Амбруазу Паре (1562 г.) [4, 5]. Николаем Ивановичем Пироговым в 1864 г. на основе опыта работы в ходе Кавказской и Крымской войн 1853–1856 гг. дано наиболее полное на тот период описание газовой гангрены. Затем в период с 1883 по 1922 г. рядом ученых описаны основные ее возбудители: *C. novyi* (Нови, 1894 г.), *C. perfringens* (Уэлч и Неттал в 1892 г., Вейон и Жубер, 1893 г.), *C. sporogenes* (Мечников, 1908 г.), *C. histolyticum* (Вейнберг, Сеген, 1915 г.), *C. sordellii* (Сорделли, 1922 г.) [6].

Газовая гангрена наиболее часто возникает во время военных действий и поражает от 0,08 до 1,5% раненых [7]. Во время Гражданской войны в США 50% солдат, получивших ранения, погибли. Разрушение тканей пулевыми ранениями предрасполагало к развитию газовой гангрены преимущественно из-за повреждения сосудов тканей в результате гидродинамического удара. Из-за ограниченности средств у хирургов зачастую использовалась «профилактическая ампутация». Газовая гангрена была известна и в период Отечественной войны 1812 г., и, вероятно, имела близкий процент летальности. Во время Первой мировой войны методы лечения улучшились, но и вооружение стало более совершенным. Заболеваемость достигала 10% среди раненых. За этот период от газовой гангрены погибло ~100 тыс. немецких солдат. Во время Второй мировой войны медицинская эвакуация, усовершенствованные методы хирургической обработки в полевых госпиталях, антитоксины и антибиотики позволили снизить заболеваемость. Смертность от данной инфекции у США на Западном фронте в Европе составила 8 на 1000 раненых, у Франции – 12,3 на 1000, а среди раненых военнопленных, получавших менее качественное лечение, – 51,9 на 1000. В начале Второй мировой войны (1940–1942 гг.) смертность от газовой гангрены составляла 50%, в 1943 г. – 30%, а в Северо-Западной Европе в 1944–1945 гг. – 22% [8].

Пенициллин начал использоваться в профилактических целях для предотвращения газовой гангрены во время Второй мировой войны. При этом заболеваемость постепенно снижалась [8]. В 1944 г. нашими соотечественниками был разработан и метод производства бактериофагов, используемых в госпиталях для лечения газовой гангрены [9].

Заболеваемость газовой гангреной на европейских театрах военных действий была выше, чем при операциях в пустыне, вероятно, потому что долины Европы были сильно загрязнены *C. perfringens* (50 тыс. спор/г почвы), а, например, в Сахаре эта бактерия обнаруживалась редко. Возможно, это связано с неблагоприятными условиями формирования и сохранения спор в пустынном климате. Во время войн в Корее, Вьетнаме, Персидском заливе и Афганистане быстрая эвакуация, хирургическая обработка, реконструкция сосудов, улучшенные поддерживающие меры, а также повышение эффективности и доступности антибиотиков значительно снизили заболеваемость [8].

В настоящее время газовая гангрена продолжает вызывать проблемы как при боевых действиях, так и в гражданских секторах, что также связано с травматическими повреждениями. Среди ~2800 пациентов после землетрясения в Вэньчуане (Китай) в 2008 г. более чем у 2,4% развилась газовая гангрена. В последние годы среди гражданского населения описаны случаи нетравматической газовой гангрены и случаи, связанные с употреблением зараженного спорами героина [10]. Сообщалось о случаях заражения *C. sordellii* у женщин, перенесших естественные роды, кесарево сечение или медикаментозный аборт [8].

В мирное время анаэробная инфекция, по данным разных авторов, встречается в 0,15–1,76% случаев травм [10]. Частота возникновения газовой гангрены в различных странах оценивается от 0,1 до 1,0 случая на 1 млн жителей в год и в первую очередь связана с травмами, зачастую загрязненными землей, и спонтанными случаями газовой гангрены, возникающими без явной внешней травмы или связанными с колоректальными злокачественными новообразованиями [11]. В настоящее время в США заболеваемость составляет ~1000 случаев в год, но она выше во время стихийных бедствий [1]. Из них 50% связаны с травматическими повреждениями, 35% возникают в послеоперационный период и 10% имеют спонтанную этиологию. Уровень смертности даже сейчас приближается к 100% без медикаментозного вмешательства [12].

Случаев описания газовой гангрены как раневой инфекции в русскоязычной литературе крайне немного, однако важно отметить ряд интересных работ отечественных авторов: [7, 11, 13–16]. В работе Пильникова с соавт. [17] дано подробное описание газовой гангрены как раневой инфекции у военнослужащих при минно-взрывных травмах на большой выборке (199 раненых) с представленными статистическими данными. Авторами описано снижение летальности в 2 раза (с 15,3 до 6,9%) при грамотно выполненной ампутации среди пострадавших с минно-взрывной травмой конечностей, осложненной анаэробной инфекцией. Перечислены выделенные возбудители анаэробной инфекции: *C. bifermentas* (31%), *C. perfringens* (22%), *C. sporogenes* (15%), что необычно, поскольку наиболее распространенным возбудителем считается *C. perfringens*, а случаев с *C. bifermentas* и *C. sporogenes* практически не описано. Инкубационный период составлял от 3 ч до 1–3 суток. Газовая гангрена чаще была представлена двумя формами: клостридиальным целлюлитом (58%) и клостридиальным мионекрозом (42%) [17].

Как и у возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*), споры *C. perfringens* прочны и термостойки, но, в отличие от *B. anthracis*, нет доказательств, что споры могут передаваться воздушно-капельным путем, вызывая заболевание. Споры *C. perfringens* могли рассматриваться как инфекционные агенты для оружия, которое вызывает травматические повреждения. Например, осколочное оружие, разработанное Японией во время Второй мировой войны, приводило к доставке спор в раны и последующему возникновению газовой гангрены [18].

Возникновение, течение и лечение газовой гангрены

Травматическая газовая гангрена составляет ~85% случаев и вызывается случайными (50%), в т.ч. полученными в ходе боевых действий, или хирургическими (35%) травмами [8]. Эта инфекция может быстро привести к летальному исходу и требует незамедлительного лечения [2].

Патогенез может быть рассмотрен в 4 этапа: контаминация раны и распространение бактерий; выработка токсинов; локальное и регионарное разрушение тканей; системная токсичность, включая шок и органную недостаточность [8].

Серьезная травма приводит к загрязнению и проникновению бактериальных спор в мягкие ткани через рану, в основном из окружающей среды (клостридии распространены в почве по всему миру) или микрофлоры организма-хозяина, так как многие клостридии являются транзитными или постоянными членами нормальной микрофлоры кожи и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека и животных [2]. Попадая в рану, например, вместе с частичками почвы с пулей вглубь раневого канала, в течение 3–5 суток бактерии прорастают в вегетативные формы. При этом важно наличие глубокого раневого канала (при ранении осколками, например), раневой полости, плохо сообщающейся с внешней средой, и ишемии пораженного участка вследствие повреждения сосудов или наложения жгута на длительный срок [19].

К предрасполагающим состояниям относятся травмы типа раздавливания, разрывы крупных или средних артерий и открытые переломы длинных костей, загрязненные почвой, содержащей споры бактерий. Газовая гангрена брюшной стенки и боков возникает после проникающих ранений (например, ножевых или огнестрельных), достаточных для нарушения целостности кишечника, что приводит к вытеканию содержимого в брюшную полость и мягкие ткани [8].

Простого присутствия *C. perfringens* в ранах недостаточно, чтобы вызвать гангрену. Например, во время Второй мировой войны ~80% ранений были заражены *C. perfringens*, но только у 8 из 1000 (0,8%) раненых развилась гангрена [8]. Описано выявление анаэробов в 60–90% ран, но гангрена возникла у 1–2% раненых [7].

Инкубационный период от момента ранения до развития гангрены варьирует в зависимости от вида инфицирующих клостридий от 1–6 дней, но может достигать 6 нед. Среднее время инкубации для трех наиболее распространенных возбудителей составляет: *C. perfringens* – 10–48 ч, *C. septicum* – 2–3 дня, *C. novyi* – 5–6 дней [2].

Низкий окислительно-восстановительный потенциал, метаболиты разлагающегося белка и кислый pH в ране способствуют прорастанию спор и стимулируют размножение вегетативных форм. За этим следует выработка экзотоксинов, включая гемолизины, коллагеназы, протеазы и липазы, которые ответственны за поражения и характерные клинические признаки [20].

Газовая гангрена характеризуется возникновением боли в месте заражения и быстрым развитием раны, содержащей серозно-кровянистые выделения и пузырьки газа. Развивается мышечный отек и уплотнение, которые сменяются кожными волдырями от синеватого до темно-бордового цвета. Позже такая ткань может разжижиться и отслоиться. Граница между здоровой и некротизированной тканью часто увеличивается на несколько сантиметров в час, несмотря на антибактериальную терапию [8]. Пораженная мышца обесцвечивается (фиолетовая пятнистость), отекает и выделяет зловонный экссудат. Из продуктов анаэробного брожения образуются пузырьки газа. По мере увеличения проницаемости капилляров увеличивается накопление жидкости, а венозный отток уменьшается. Клостридии размножаются в увеличивающейся области мертвой ткани, выделяя токсины в местные ткани и системный кровоток [2]. Симптомы обычно прогрессируют до быстрого бактериального распространения, приводящего к сепсису, токсемии, шоку и смерти [1]. Клостридиальный сепсис может возникнуть на поздних стадиях заболевания. Причиной смерти обычно является шок с массивным гемолизом и почечной недостаточностью [2].

Для лечения газовой гангрены применяются высокие дозы противомикробных препаратов в сочетании с хирургической обработкой раневых тканей или гипербарической оксигенацией [16]. Пенициллин является препаратом выбора при всех клостридиальных раневых инфекциях, хлорамфеникол – антибиотиком второго выбора [2].

С точки зрения биологической безопасности актуально отметить растущее число случаев антибиотикорезистентности среди возбудителей газовой гангрены [16]. Отмечается устойчивость *C. perfringens* к линкозамидам и пенициллину [21]. У ряда штаммов выявлены гены устойчивости аминогликозидам и тетрациклину [22]. Известно, что до 33% изолятов из образцов мяса сельскохозяйственных животных содержат *C. perfringens*, устойчивые к ампициллину, тетрациклину, амоксициллину, ципрофлоксацину и хлорамфени-

колу. Множественная лекарственная устойчивость была выявлена у 38% изолятов [23]. А как известно, от естественных носителей антибиотикоустойчивые штаммы могут попасть и в окружающую среду, в т.ч. почву.

Возбудители газовой гангрены и их токсины

Возбудители газовой гангрены относятся к роду *Clostridium*, который объединяет >100 видов. К возбудителям травматической газовой гангрены у человека относят следующие виды с соответствующими токсинами: *C. perfringens* тип А (α-токсин, перфринголизин О), *C. novyi* (α-токсин), *C. septicum* (α-токсин), *C. histolyticum* (летальный фактор), *C. sordellii* (летальный токсин TcsL и геморрагический токсин TcsH). Важно отметить, что упомянутые здесь α-токсины не обязательно структурно или функционально связаны [20]. 80% случаев травматической газовой гангрены связанны с *C. perfringens*, в то время как *C. septicum* является основным причиной спонтанных случаев. Общая вовлеченность *C. septicum* в газовую гангрену, спонтанную или нет, оценивается в 20% [19].

C. perfringens – это грамположительная спорообразующая прямая или слегка изогнутая палочковидная неподвижная бактерия с тупыми концами, шириной 0,6–2,4 мкм и длиной 1,3–19,0 мкм. На агаре с бараньей кровью наблюдаются крупные плоские колонии с шероховатыми краями или гладкие и куполообразные колонии с большими зонами частичного гемолиза, расположенными вне узких зон полного гемолиза [24].

C. perfringens считается анаэробной, поскольку не может расти в присутствии воздуха. Но важно отметить, что данная бактерия по сравнению с большинством других анаэробов относительно устойчива к кислороду. Кроме того, она обладает чрезвычайно быстрым временем удвоения, время ее генерации <10 мин. Это способствует вирулентности, позволяя быстро достигать патогенных нагрузок. *C. perfringens* не имеет жгутиков, но демонстрирует скользящую подвижность, опосредованную пилями IV типа, которые способствуют образованию биопленки и адгезии [1]. Это в совокупности обуславливает опасность ее применения в качестве агента бактериологического оружия.

C. perfringens опасна и тем, что она повсеместно присутствует в окружающей среде, гниющей растительности, почве, и нормальной микробиоте ЖКТ людей и животных, при этом являясь патогеном людей и домашнего скота.

Вирулентность этой бактерии обусловлена арсеналом из ~20 токсинов: α (CPA), β (CPB), ε (ETX), ι (CPI), энтеротоксин (CPE), θ (перфринголизин О, PFO), β-2 (CPB2), TpeL, NetB, NetF, BecA/B, NanI, NanJ, κ, μ, λ и δ [25, 26]. Модели продукции токсинов значительно различаются среди разных штаммов, что дает основу для недавно пересмотренной схемы классификации, которая относит изоляты *C. perfringens* к одному из 7 типов (A–G). *C. perfringens* также производит широкий спектр внеклеточных деградирующих ферментов, таких как протеазы (клострипаин), гиалуронидаза, коллагеназа и эндогликозидазы [1]. Производство обоих токсинов регулируется системой кворум-сенсинга, подобной Agr, а также двухкомпонентной регуляторной системой VirS/VirR [27].

Геном *C. perfringens* состоит из одной кольцевой хромосомы и дополнительных плазмид. Многие из продуцируемых токсинов кодируются плазмидами, включая токсины β, ε и ι, в то время как гены, кодирующие главные токсины – перфринголизин (*pfoA*) и α-токсин (*plc*), расположены на хромосоме [28], что, например, снижает вероятность потери бактерией главных токсинов при искусственном накоплении ее биомассы и распылении споровой суспензии.

Штаммы типа А, не имеющие плазмид, вызывают газовую гангрену и другие гистотоксические инфекции. Эти штаммы вырабатывают только α-токсин и перфринголизин и являются наиболее распространенными штаммами *C. perfringens* в окружающей среде, поэтому обладают большими возможностями для инфицирования ран [1].

α-токсин (фосфолипаза С или сфингомиелиназа, CPA) вырабатывают все типы C. perfringens. Исторически это первый бактериальный токсин, у которого была показана ферментативная активность. LD_{50} для CPA составляет 3 мкг/кг для мышей [25]. Он необходим для мионекроза, опосредованного *C. perfringens* [1]. Широко признано, что CPA является основным токсином газовой гангрены, поскольку только штаммы, продуцирующие CPA, способны вызывать типичную патологию мионекроза с тромбозом в модели мионекроза у мышей [28].

Это цинковая металлофосфолипаза, обладающая как фосфолипазной, так и сфингомиелиназной активностью. CPA является гемолитическим, цитотоксическим, дермонекротическим и летальным внеклеточным токсином. Он вызывает сокращения кровеносных сосудов и гладких мышц, агрегацию тромбоцитов, выработку супероксида и высвобождение цитокинов. Вместе с перфринголизином О он отвечает за отличительную гистопатологическую особенность мионекроза, опосредованного *C. Perfringens*, – скудность притока полиморфноядерных лейкоцитов в очаг инфекции [20]. Воздействие CPA на ткани обусловлено расщеплением фосфолипидов в мембранах клеток – т.е. разрушением мембран клеток хозяина. Взаимодействие CPA с мембранами клеток-мишеней включает ряд поверхностных гидрофобных аминокислот и образование кальциевых мостиков с фосфолипидной фосфатной группой [29]. Разрушение бислоя фосфолипидов вместе с конечными продуктами этих реакций, диацилглицерином и церамидом, активирует липидный метаболизм в мембранах. CPA также способствует повреждению фосфолипидных бислоев, вызванному перфринголизином О [20]. В конечном итоге CPA приводит к эндоцитозу и гибели клеток [24].

CPA также вызывает прочную адгезию нейтрофилов к белкам внеклеточного матрикса и их накопление на эндотелии сосудов, что частично объясняет лейкостаз, наблюдаемый при газовой гангрене [1]. Эксперименты, проведенные с использованием неактивного мутантного варианта CPA H148G, показали, что его ферментативная активность была необходима для снижения уровней эритробластов [20].

Мутанты *C. perfringens*, не способные вырабатывать CPA, почти полностью ослабевают в мышиной модели газовой гангрены. В лабораторных условиях токсин является цитолитическим или цитотоксичным по отношению к ряду эукариотических клеток, включая эритроциты, макрофаги и фибробласты. В сублитических концентрациях токсин вызывает недостаточный транспорт фагоцитов к месту инфекции, вазоконстрикцию кровеносных сосудов, снабжающих место

инфекции, и образование воспалительных медиаторов, таких как тромбоксаны и простагландины [29].

Предполагается, что CPA использует ганглиозид GM1 на клетках хозяина в качестве рецептора. Через взаимодействие с GTP-связывающими белками типа Gi CPA может активировать эндогенные ферменты хозяина с аналогичной активностью фосфолипазы и сфингомиелиназы. В дополнение к этим ферментативным событиям в плазматической мембране связывание с GM1 позволяет CPA взаимодействовать с киназой рецептора тропомиозина A, что приводит к активации пути MEK/ERK [1].

CPA – это хромосомно кодируемый белок массой 43 кДа и длиной 370 аминокислотных остатков (а.о.) [20]. Синтез данного белка кодируется геном *plc* или *cpa*. CPA включает в себя мембранно-связывающий C-домен (256–370 а.о.), состоящий из β-слоя, каталитический N-домен (1–246 а.о.), состоящий из α-спиралей, и центральный петлевой домен, содержащий сайт связывания ганглиозида GM1a [1, 20].

CPA синтезируется как препрототоксин с лидерной последовательностью из 31 а.о., которая отщепляется при секреции из бактериальной клетки, и C-концевым участком из 45 а.о., который отщепляется протеазами хозяина, такими как фурин. Прототоксин массой 46 кДа связывается с белковыми рецепторами на мембране клетки хозяина. После расщепления протеазой на мембране зрелый токсин (43 кДа) претерпевает конформационные изменения и олигомеризуется, образуя гептамерный комплекс препоры, который необходим для образования пор. Расщепление C-концевого участка позволяет сформировать трансмембранную пору [20].

CPA имеет сходство аминокислотных последовательностей и/или антигенную перекрестную реактивность с фосфолипазами *C. bifermentans*, *C. novyi*, *C. absonum* и *C. barati*. N-концевой домен имеет значительное сходство последовательности с ферментами фосфолипазы C *Bacillus cereus*, *C. bifermentans* и *Listeria monocytogenes* [1].

Перфринголизин O (PFO, θ-токсин), продуцируется большинством штаммов *C. perfringens* [1]. PFO способствует быстрому разрушению тканей несколькими механизмами. В месте инфекции он действует как цитолизин, способствуя прямому повреждению сосудов, а более низкие концентрации токсина активируют полиморфноядерные лейкоциты и эндотелиальные клетки, приводя к повреждению дистальных сосудов путем стимуляции адгезии лейкоцитов к эндотелию. В результате возникают лейкостаз, тромбоз, снижение перфузии и гипоксия тканей. PFO также способствует развитию шока посредством индукции воспалительных медиаторов, таких как факторы активации тромбоцитов и некроза опухолей, интерлейкин-1 и интерлейкин-6 [2]. PFO цитотоксичен для полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов в высоких концентрациях, а также ухудшает продукцию супероксид-анионов и фагоцитоз опсонизированных частиц комплемента в более низких концентрациях. PFO способствует лизису эндосомальной мембраны в макрофагах, позволяя *C. perfringens* выходить из фагосом, предотвращает полимеризацию актиновых филаментов в лейкоцитах и миграцию нейтрофилов [1]. PFO способствует тому, что эндотелиальные клетки секретируют факторы адгезии и хемокины, которые могут заставлять тромбоциты секретировать факторы активации и прилипать к эндотелиальным клеткам сосудов, образовывать тромбы. Это приводит к снижению скорости кровотока и гипоксии инфицированных тканей. Известно, что тяжесть патологического повреждения газовой гангрены, вызванной мутантом *pfoA*, была значительно снижена [30].

PFO действует синергически с CPA. Сосудистый лейкостаз и недостаточность инфильтрации лейкоцитов в месте инфекции являются двумя характеристиками газовой гангрены. Известно, что внутримышечная инъекция CPA запускает образование внутрисосудистых агрегатов, состоящих из тромбоцитов. Фибрин и лейкоциты добавляются к агрегату, закупоривая кровеносные сосуды. Тромбы уменьшают или даже полностью останавливают местный кровоток. Этот процесс ухудшает движение воспалительных клеток к инфицированной ткани, что может объяснить отсутствие фагоцитарных клеток на поздних стадиях газовой гангрены. PFO при этом вызывает повышенную экспрессию молекул адгезии, таких как CD11b/CD18 на лейкоцитах и CD106 и PAF на эндотелиальных клетках человека. Это полезно для C. perfringens, находящихся в ткани, поскольку это одновременно способствует анаэробным условиям и уменьшает воспаление. Нарушение эндотелия способствует прогрессирующему отеку. Отсутствие воспалительных клеток в инфицированной ткани может быть обусловлено и прямым цитолитическим эффектом PFO и CPA [28].

PFO – это порообразующий гемолитический токсин, принадлежащий к семейству холестеринзависимых цитолизинов, которое включает стрептолизин O *Streptococcus pyogenes*, листериолизин O *L. monocytogenes*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae* и родственные цитолизины, продуцируемые несколькими другими клостридиями. PFO вырабатывается большинством, но не всеми штаммами *C. perfringens*. Структурный ген *pfoA* расположен на хромосоме. Зрелый перфринголизин O (53 кДа, 473 а.о.) секретируется в виде водорастворимого мономера и связывается с мембранами клеток хозяина холестерин-зависимым образом. Связывание с клеточной мембраной инициирует олигомеризацию и образование порового комплекса, который может содержать до 50 мономерных субъединиц и отвечает за лизис клеток [20]. Высокое сродство PFO к своему холестериновому рецептору способствует концентрации токсина в молекулах холестерина, расположенных дугами на плазматической мембране, что обеспечивает возможность олигомеризации и внедрения в мембрану [1].

Первичная структура PFO, синтезированная с нуклеотидной последовательности гена *pfoA*, включает 500 а.о. и сигнальный пептид длиной 27 а.о. Сигнальный пептид распознается и расщепляется при прохождении через клеточную мембрану, обеспечивая секрецию PFO по общему секреторному пути, что приводит к образованию внеклеточного водорастворимого мономера [28]. Мономеры PFO имеют гидрофильную, богатую β-слоями структуру, которую можно разделить на 4 домена [20].

Контакт домена с мембраной клетки-хозяина приводит к тому, что 2 α-спиральных IV домена в домене III изменяют конформацию, образуя 2 β-шпильки, которые встраиваются в мембрану и пронизывают ее. До 50 мономеров PFO олигомеризуются, образуя большую мембранную пору размером 15 нм [27]. Образующиеся в мембране поры вызывают лизис клеток посредством коллоидно-осмотического механизма.

Хотя PFO способен индуцировать или препятствовать внутриклеточной сигнализации, его основная активность связана с изменением целостности мембраны [1]. Критическая роль PFO в развитии газовой гангрены делает его важной целью для разработки новых противоинфекционных препаратов.

Отдельного внимания заслуживает ε-токсин (ETX). Этот токсин продуцируется штаммами *C. perfringens* типов B и D, является их основным фактором вирулентности и ответственен за развитие энтеротоксемии и других опасных заболеваний у травоядных животных (овцы, козы, крупный рогатый скот) [31].

Однако ETX, как и α-токсин *C. perfringens*, в настоящее рассматривается как потенциальный биотеррористический или боевой биологический агент в США и классифицируется CDC (Centers for Disease Control and Prevention, США) как биологический агент категории B. Биоагенты категории B считаются умеренно легко распространяемыми, могут приводить к умеренной заболеваемости и низкой смертности, а также требуют наличия диагностического оборудования и усиленного эпидемиологического надзора. К категории B относятся стафилококковый энтеротоксин B, ETX *C. perfringens* и рицин [32]. Во Франции ETX также классифицируется как потенциальное биологическое оружие и требует специального разрешения на лабораторные работы [26]. По мнению американской стороны, Ирак был заинтересован в токсинах *C. perfringens*, в т.ч. и ETX, как токсинном оружии [27]. В Постановлении Правительства Российской Федерации от 16 июля 2022 г. №1287 (в редакции от 13 декабря 2023 г.) указано, что типы *C. perfringens*, продуцирующие ETX, входят в список микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю.

Наибольший потенциал использования этого токсина в биотерроризме заключается в его аэрозольной форме. Вдыхание ETX может привести к повреждению эндотелиальных клеток легочных сосудов с последующим первичным поражением легких, характеризующимся повышенной проницаемостью сосудов и отеком. Поглощенный токсин может попасть и в другие органы, вызывая поражение почек, сердца и центральной нервной системы. При уровне LD_{50} для мышей 65–110 нг/кг ETX является третьим по силе бактериальным токсином, после ботулинического и столбнячного [33]. Кроме того, для сравнения, LD_{50} вещества VX составляет 15 мкг/кг , а токсинов *C. perfringens* – 0,1–5 (для α и ε) [34]. Смертельная внутривенная доза ETX для крысы составляет 100 нг/кг. Сопоставимая парентеральная доза для человека весом 70 кг составила бы 7 г [35]. По другим оценкам, LD_{50} для человека составляет 1 мг/кг, и при попадании через дыхательные пути достаточные дозы ETX теоретически могут быстро ослабить большое количество гражданского населения и военнослужащих или даже вызвать смерть значительного числа людей. Этот токсин стабилен при комнатной температуре в течение нескольких недель и гораздо дольше при более низких температурах. Кроме того, ETX может быть рассеян в пищевых продуктах, предназначенных для потребления человеком [31, 32, 34].

Отравление человека ETX в естественных условиях происходит крайне редко, поэтому большая часть информация об отравлении ETX получена в результате исследований на животных.

ETX вырабатывается бактериями в экспоненциальной фазе роста в качестве прототоксина. Затем под действием специфических протеаз он превращается в активный токсин в кишечнике. Активный ETX представляет собой белок с молекулярной массой 29 кДа. Это порообразующий токсин, который повышает проницаемость клеток для молекул и ионов [24].

ETX взаимодействует с клеточной мембраной эукариотических клеток и создает в ней поры. Это повреждение приводит к быстрым дегенеративным и некротическим изменениям в клетках, вызывая органную недостаточность. Токсин действует локально в кишечнике, повышая проницаемость слизистой оболочки, а затем проникает в кровоток и распространяется по другим органам, вызывая микрососудистые эндотелиальные поражения, в основном в головном мозге, легких и почках, что приводит к токсическому шоку и смерти. ETX связывается с энтероцитами, вызывает накопление жидкости и повышение проницаемости кишечника, открывая плотные соединения слизистой оболочки, расширяя межклеточные пространства и вызывая дегенеративные изменения в собственной пластинке. Эти изменения влияют на гомеостаз жидкости. В почках он вызывает интерстициальное кровоизлияние с отеком и дегенерацией канальцевого эпителия. В головном мозге нарушает целостность гематоэнцефалического барьера, вызывая двусторонние симметричные поражения в нескольких областях, которые проявляются в виде периваскулярного отека, приводящего к очагам кровоизлияний и некроза и вызывающего повреждение нейронов. ETX оказывает прямое и быстрое воздействие на мозг, воздействуя на специфические глутаматергические нейроны, стимулируя высвобождение глутамата и вызывая повреждение нейронов, что может способствовать возникновению неврологических симптомов, часто наблюдаемых у животных, страдающих энтеротоксемией. Он также вызывает высвобождение дофамина клетками гиппокампа [31].

ETX связывается с рецепторами, присутствующими на внешней поверхности мембран эндотелиальных клеток сосудов определенных органов, включая головной мозг, почки и печень. Точная идентификация клеточного рецептора ETX остается неизвестной, но известно, что рецепторы зависят от холестерина и сфингомиелина и находятся в определенных областях клеточной мембраны, известных как липидные рафты. Известно, что ETX связывается с клеточным рецептором 1 вируса гепатита A (HAVCR1) *in vitro*, и подтверждено, что эти рецепторы способствуют цитотоксичности белка [31]. ETX также действует на несколько клеточных линий: MDCK, G-402 и mpkCCD C14, которые имеют специфический рецептор для ETX [34].

Ввиду отсутствия достоверных или подтвержденных данных о воздействии на человека (известно только о 2 случаях отравления человека, опубликованных в 1950-х гг.) предполагается, что между воздействием и появлением клинических признаков и симптомов проходит латентный период продолжительностью от 1 до 12 ч [32]. Исследования показали, что ETX может образовывать поры в зрелых эритроцитах человека и вызывать гемолиз за короткий промежуток времени [36]. Кроме того, учитывая, что некоторые линии клеток человека чувствительны к ETX, практически неоспоримо, что контакт людей с этим токсином в естественных

условиях и искусственно вызванным образом может представлять опасность для здоровья [31]. Однако в настоящее время, согласно открытым источникам, не существует зарегистрированных эффективных препаратов для лечения интоксикации ETX [37].

Ген etx кодирует синтез ETX и располагается на плазмидах *C. perfringens*. По крайней мере две из этих плазмид являются конъюгативными, т.е. реплицируются автономно, обеспечивают конъюгацию и могут передаваться другим клеткам *C. perfringens* путем горизонтального переноса [31].

Этот белок относится к семейству аэролизиноподобных β-порообразующих токсинов, в которое также входит α-токсин *C. septicum*. Хотя эти токсины имеют поразительное структурное сходство, у них отсутствует гомология в аминокислотных последовательностях [31].

ETX секретируется в виде прототоксина длиной 296 а.о. и массой 33 кДа, а затем активируется протеазами, такими как химотрипсин и трипсин, или *in vitro* с помощью λ-токсина *C. perfringens*. Активация происходит путем удаления 13 а.о. с N-конца и 29 а.о. с С-конца. Удаление С-концевых аминокислот является критическим для продуцирования активного ETX [22, 31].

ETX состоит из 3 доменов. I домен (N-концевой), как полагают, важен для связывания с рецептором. Средний домен II, вероятно, необходим для встраивания в мембрану и участвует в олигомеризации белка, образовании пор и стабилизации. Аминокислотные замены в домене II приводят к изменению цитотоксичности и влияют на характеристики каналов, образованных токсином. III домен (С-концевой) также предположительно участвует в олигомеризации и встраивании в мембрану [31].

Активированный токсин связывается с рецепторами (возможно, HAVCR1) на клеточной мембране. В этих областях происходит его олигомеризация, и образуются крупные белковые комплексов с молекулярной массой ~155–220 кДа, состоящие из 7 мономеров – гептамеры. Так формируется препора, которая затем быстро внедряется в мембрану с образованием активной поры с диаметром 0,4–1,0 нм и небольшой селективностью по анионам. Активные поры пропускают ионы и молекулы массой до ~0,5 кДа, что вызывает клеточные изменения и повреждения [31]. Формирование пор в клетках приводит к быстрой потере внутриклеточного K+ и повышению цитоплазматических уровней Ca^{2+} и Na^{+}. Это запускает быструю гибель клеток из-за процесса некроза и истощения АТФ [22, 38].

C. septicum – условно-патогенная грамположительная анаэробная палочка с субтерминальными спорами. На кровяном агаре она образуют гемолитический роящийся рост. Она часто встречается в почве и ЖКТ животных и иногда – человека [24]. Важно, что *C. septicum* дольше выживает в аэробной среде, чем *C. perfringens*, т.е. является более устойчивой к кислороду воздуха. Эта бактерия вызывает газовую гангрену и другие серьезные инфекции. Многое известно о развитии газовой гангрены, вызванной *C. septicum*, у животных [20]. У людей же *C. septicum* чаще описывают как возбудителя спонтанной газовой гангрены, которая ассоциируется с колоректальными злокачественными новообразованиями [12], но также встречаются данные как о возбудителе травматической газовой гангрены.

В литературе представлены данные об антибиотикоустойчивости *C. septicum*. Обычно этот микроорганизм чувствителен к пенициллину или метронидазолу, но у него была описана устойчивость к ванкомицину и клиндамицину [19]. Как правило, используемые антибиотики включают ванкомицин, метронидазол, хлорамфеникол и высокие дозы внутривенного пенициллина и клиндамицина [39].

Из-за аэротолерантности *C. septicum* демонстрирует способность размножаться в здоровых тканях даже при отсутствии строго анаэробной среды. Важно, что в мышиной модели бактериальная нагрузка, необходимая для возникновения инфекции, в 300 раз ниже, чем у *C. perfringens*, и всего лишь небольшое количество спор *C. septicum* может вызвать смертельное заболевание у пациентов с ослабленным иммунитетом [19], например у военнослужащих, длительно находящихся в условиях боевых действий. Способность длительно сохраняться и размножаться в присутствии кислорода воздуха и низкую заражающую дозу важно учитывать и обратить внимание на данный микроорганизм с точки зрения биологической безопасности.

Как и многие жгутиковые бактерии, *C. septicum* обладает способностью развивать коллективное роевое поведение, особенно в условиях ограничения питательных веществ, участвуя в координации движений на поверхностях, тем самым облегчая инвазию тканей. Кроме того, *C. septicum* демонстрирует способность образовывать биопленки посредством жгутиков или белков, ассоциированных с биопленкой, что обычно коррелирует с устойчивостью к антибиотикам [19].

C. septicum имеет несколько важных факторов вирулентности и продуцирует 4 основных токсина: α, β, δ и γ, а также ферменты, разрушающие ткани: нейраминидазу, протеазу, сиалидазу и фибринолизин.

α-токсин – основной токсин *C. septicum*, который кодируется геном csa. Это летальный некротизирующий порообразующий цитолизин, признанный фактором, необходимым для вирулентности. Он принадлежит к семейству аэролизинов, как и ε-токсин *C. perfringens* и токсин *Aeromonas hydrophila*. Этот α-токсин не гомологичен α-токсину (CPA) *C. perfringens* и, в отличие от него, не обладает фосфолипазной активностью. α-токсин *C. septicum* использует гликозилфосфатидилинозитол-якорные белки на мембране клеток-мишеней в качестве рецептора. Он секретируется как неактивный прототоксин, который расщепляется вблизи С-конца мембраносвязанным фурином или фуриноподобными протеазами хозяина, затем олигомеризуется и образует мембранные поры. Эти поры играют решающую роль в некрозе тканей, приводя к осмотическому лизису клеток и внутриклеточному притоку ионов Ca^{2+}, инициируя каскад сигналов, приводящий к запрограммированному некрозу клеток [19].

α-токсин приводит к снижению перфузии тканей, прокладывая путь для возникновения анаэробных условий. Он снижает хемотаксический ответ нейтрофильных полиморфноядерных лейкоцитов в месте инфекции. α-токсин активно способствует секреции HMGB1, белка, который влияет на нейтрофил-зависимые антибактериальные механизмы и может участвовать в развитии молниеносного септического состояния. Этот токсин вызывает увеличение проницаемости капилляров, что, вероятно, объясняет частое метастатическое распространение [19].

Образование трансмембранных пор необходимо для мионекроза, но осмотический лизис клеток, опосредованный порами, не является единственным следствием интоксикации α-токсином. Обработка миобластов мыши C_2C_{12} α-токсином приводит к быстрому притоку Ca^{2+} в клетку, но не вызывает апоптоз. Вместо этого α-токсин вызывает запрограммированный клеточный некроз, что согласуется с тем фактом, что он более активен против ядросодержащих клеток. Генетические исследования показали, что α-токсин необходим для опосредованного *C. septicum* мионекроза у мышей. Мутация гена *csa* приводит к потере вирулентности, которая восстанавливается путем комплементации *csa* дикого типа [20].

Роль других токсинов *C. septicum* в вирулентности в значительной степени не известна [20]. β-токсин является ДНКазой. γ-токсин, гиалуронидаза, может играть роль в распространении бактерий и их токсинов через ткани, поэтому, по крайней мере частично, будет ответственен за характерные поражения при газовой гангрене, которыми являются отек и кровоизлияние. δ-токсин (D-септиколизин, гемолизин, зависимый от кислорода [8]) обладает некротизирующим действием, которое можно продемонстрировать путем внутрикожного введения морским свинкам [24].

C. sordellii впервые был выделен в 1922 г. Сорделли из острой отечной раневой инфекции у пациента и первоначально назывался *Bacillus oedematis sporogenes* [20].

C. sordellii продуцирует не менее 5 токсинов, два из которых необходимы для вирулентности, а именно летальный токсин (TcsL, LT) и геморрагический токсин (TcsH, HT). Эти два токсина тесно связаны с токсинами A (TcdA) и B (TcdB) *C. difficile* соответственно. TcsL и TcsH обладают активностью гликозилирования, их основными мишенями являются эндотелиальные клетки. При инфекции у животных оба токсина связываются с пока не известными рецепторами на эндотелиальных клетках, где интернализируются и вызывают нарушение цитоскелета. В результате происходит потеря клеточной адгезии. Этот эффект может частично объяснять сильный отек и кровоизлияние при инфекции *C. sordellii* [20].

TcsL и TcsH являются представителями семейства больших клостридиальных цитотоксинов (Large Clostridial Cytotoxins/LCC), которые имеют молекулярную массу от 250 до 308 кДа. Все LCC обладают значительным сходством аминокислот (идентичность 26–76%), гликозилтрансферазной активностью и модифицируют сигнальные молекулы, контролирующие клеточный цикл, апоптоз, транскрипцию генов и структурные функции актина, такие как морфология клеток, миграция и полярность. Модификация сборки и организации актинового цитоскелета, предположительно, приводит к массивной капиллярной проницаемости, характерной для инфекции *C. sordellii* [8].

Было также показано, что нейраминидаза *C. sordellii* способствует лейкемоидной реакции, в частности за счет усиления пролиферации клеток-предшественников гранулоцитов. Другие экзотоксины *C. sordellii* включают устойчивый к кислороду гемолизин, ДНКазу, коллагеназу и лизолецитиназу, однако их роль в патогенезе широко не изучалась [8].

Еще один вид клостридий, на котором стоит остановиться, это *C. novyi* типа A. Данный вид, первоначально названный *Bacillus oedematis* 2, был выделен в 1894 г. Нови из поражений морских свинок, умерших после инъекций казеина. Эта бактерия обычно встречается в почве и редко – в микробиоме здоровых животных. Описаны случаи газовой гангрены, вызванной *C. novyi* типа A у людей, связанной с применением инъекционных наркотиков [10].

C. novyi типа A продуцирует α-токсин (TcnA), крупный гликозилирующий токсин с некротизирующей и летальной активностью, который считается его основным фактором вирулентности. Подобно TcsL и TcsH *C. sordellii*, TcnA *C. novyi* действует на эндотелиальные клетки, вызывая потерю межклеточного контакта, что приводит к отеку, за которым следуют падение артериального давления, полиорганная недостаточность и смерть. *C. novyi* типа A также продуцирует новилизин – цитолизин, повреждающий клеточные мембраны [20].

Из-за вырабатываемых токсинов и высокой устойчивости спор *C. perfringens* и другие клостридии представляют собой возможный источник для производства биологического оружия. Они потенциально могут быть использованы для провоцирования вспышек пищевого отравления или газовой гангрены как раневой инфекции. Споры могут быть применены в качестве компонентов бактериологического оружия или при террористических атаках. Споры бактерий обладают чрезвычайной стойкостью к физическим и химическим факторам окружающей среды и признаны самой устойчивой формой жизни на планете. Они могут выдерживать высокие и низкие температуры, отсутствие питательного субстрата, воздействие антибактериальных препаратов и дезинфектантов, радиации, высокого давления, ультрафиолетового излучения [40].

Важно также учитывать, что мировой науке известно о создании техники культивирования токсинпродуцирующих штаммов *C. perfringens*. Известна и способность штаммов *C. perfringens* Darmbrand образовывать исключительно устойчивые споры. Штаммы этого типа вызывали пищевые отравления у населения Германии во время Второй мировой войны. Общий геномный фон между штаммами типа A и Darmbrand позволяет продуцировать устойчивые споры, что, в свою очередь, увеличивает вирулентность [22].

В настоящее время ведется поиск высокочувствительных и быстрых диагностических технологий обнаружения бактериальных спор, что является актуальной проблемой для решения задач биобезопасности. Например, уникальный компонент бактериальных эндоспор – дипиколиновая кислота – рассматривается как биологический маркер [40].

Рассматривается также вопрос о создании структур, подобных бактериальным эндоспорам, или прямое использование спор *C. histolyticum* и *C. novyi* для доставки препаратов или непосредственно бактерий для терапии раковых опухолей [40]. Однако доставка споровыми структурами интересующих препаратов может быть использована и для целей обеспечения биологической безопасности – например, при использовании рекомбинантных спор для создания термостабильных вакцин или доставки в организм других интересующих веществ.

Стратегии разработки вакцин против газовой гангрены

Было разработано несколько вакцин против возбудителей газовой гангрены, их применение у животных и челове-

ка хорошо задокументировано. В большинстве случаев иммунный ответ, полученный с помощью этих вакцин, определялся по уровню циркулирующего антитоксина, но есть ряд сообщений, в которых для оценки защиты использовалось заражение токсином или вирулентной культурой. В целом оказалось невозможным соотнести уровень циркулирующего антитоксина или защиту от искусственного заражения со степенью защиты, обеспечиваемой от естественного заражения [41].

Была исследована реакция морских свинок и человека на инъекции жидкого анатоксина *C. perfringens* и анатоксина с квасцами в качестве адъюванта. Анатоксин для морских свинок показал себя слабым антигеном, но значительно улучшался при добавлении квасцов. Однократная инъекция вакцины, осажденной на квасцах, привела к образованию циркулирующего в организме человека антитоксина, который проявлялся спустя 5 мес. Когда мышам вводили иммунные сыворотки, взятые через 2 нед. после иммунизации, мыши были защищены от внутрибрюшинного заражения культурой *C. perfringens*. Была также исследована (1947 г.) антигенность осажденных квасцами продуктов культивирования *C. perfringens* и *C. novyi* на морских свинках и человеке – использовали токсиновую пробу для животных и измеряли титры антитоксинов у людей. Они показали, что реакция на 3 дозы вакцины значительно улучшалась, если введение третьей дозы откладывалось на 40 нед. Также были созданы удовлетворительные вакцины против *C. perfringens* типа A, разработанные Стюартом в 1942 г. и Салтыковым, Розеповым и Земсковым в 1945 г., и против *C. novyi*, разработанные Шнеерсоном в 1957 г. [41].

В период между Первой и Второй мировыми войнами в США была разработана поливалентная вакцина против *C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum* и *C. perfringens*. Показано, что иммунизация увеличивала выживаемость животных, но масштабная иммунизация людей не проводилась из-за низких титров защитных антител и побочных реакций [16].

Стоит обратить внимание и на вакцины для животных, поскольку зачастую иммунные реакции крупного и мелкого рогатого скота и человека могут быть схожими, а подобные исследования могут дать ценный материал для разработки вакцины против газовой гангрены для человека. Был разработан ряд вакцин для крупного рогатого скота. Поскольку внеклеточные токсины играют важную роль в развитии этого заболевания, вакцины содержали как отдельные, так и множественные компоненты, которые при инъекции обеспечивают достаточный уровень циркулирующего в крови антитоксина для предотвращения вспышек заболеваний, возникающих в полевых условиях. Возможно, что вакцина того же типа может быть полезна для профилактики газовой гангрены человека [41].

Описаны интересные данные о пассивной иммунизации как методе защиты овец от газовой гангрены после заражения спорами *C. novyi* типа A и *C. perfringens* типа A при ранениях высокоскоростными снарядами. Результаты показывают, что экспериментальная вакцина против газовой гангрены защищала овец от массового заражения *C. novyi* или *C. perfringens* по крайней мере в течение года после вакцинации. Даже концентрация антитоксина <0,1 ед./мл сыворотки была достаточной для предотвращения заражения. Можно предположить, что уровень защиты, необходимый человеку, может быть сопоставим с уровнем защиты овец. Авторы утверждают, что в случае с *C. novyi* серьезность испытания, с которым столкнулись подопытные овцы, была намного выше, чем у человека даже в боевых действиях. Что касается *C. perfringens*, можно представить себе обстоятельства, при которых загрязнение ран было очень значительным. Аналогичные вакцины для человека могли бы найти применение для защиты не только людей, участвующих в боевых действиях, но и отдельных слоев гражданского населения при дорожно-транспортных происшествиях, крупных катастрофах или хирургических вмешательствах [41].

Крупномасштабное производство вакцин против клостридий для животных во всем мире остается неизменным с начала 1900-х гг. [24]. Аналогичные вакцины можно было бы создать и для человека. Вакцины против клостридий производятся различными методами, обладающими разной эффективностью, преимуществами и недостатками. Существует несколько различных вариантов вакцин и их прототипов: инактивированные бактериновые и токсоидные вакцины, клостридиальные анатоксины, рекомбинантные вакцины. Различные типы вакцин, доступные для каждого клостридиального заболевания, упомянуты в обзоре [24].

В некоторых странах для иммунизации животных используется поливалентная вакцина, состоящая из *C. perfringens* типов B, C и D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. chauvoei* и *C. sordellii* [24].

Существуют цельные формалин-инактивированные вакцины, производство которых основано на культивирования штаммов *C. chauvoei*, а затем инактивации формальдегидом. Эффективность вакцины против черной ножки была исследована на зараженных вакцинированных и невакцинированных животных. Случаев заболевания среди вакцинированных животных не было обнаружено, в то время как некоторые невакцинированные животные погибли или заболели [24].

Бактерин-токсиновая вакцина производится путем культивирования штаммов *C. perfringens* типов D, B и C и инактивируется путем обработки формальдегидом [24]. Бактериновые вакцины обладают высокой эффективностью благодаря наличию в составе бактериальных компартментов, что приводит к сильному иммунному ответу против всех антигенов. Некоторые из этих вакцин доступны без дополнительных индуцирующих агентов или адъювантов. Однако при этом могут вырабатываться антитела против несущественных компартментов патогена, не имеющих специфической функции, связанной с заболеванием, что создает дополнительную нагрузку на иммунную систему. Это может снизить эффективность адаптивного иммунитета в специфическом воздействии на патогенные факторы [24].

Токсоидная вакцина представляет инактивированный формальдегидом супернатант культуры *C. perfringens* и была получена Ловландом и его коллегами, которые доказали, что анатоксины *C. perfringens* типов A и C высокоэффективны в защите от инфекции. Были приготовлены варианты эффективных вакцин на основе анатоксинов ETX, CPB, NetB и CPA [24].

Однако, поскольку токсоидные вакцины не содержат дополнительных антигенов, таких как белки, связанные с клеточной стенкой бактерий, и представляют собой низко-

молекулярные белки, они сами по себе не обладают высокой иммуногенностью, если не вводятся в больших количествах или многократно. Для индукции достаточного адаптивного иммунного ответа у хозяина необходимо добавление адъювантов. Тем не менее чистые токсоиды являются востребованными, поскольку не создают дополнительной нагрузки на иммунную систему хозяина и безопасны, так как не содержат бактериальных клеток или спор. Кроме того, ожидается, что токсоидные вакцины будут более стабильны, чем вакцины на основе цельных культур, поскольку они менее восприимчивы к изменениям условий хранения [24].

Используя геномные данные и биоинформатику, ряд авторов предлагают разрабатывать эффективные и безопасные вакцины на основе субъединиц белков конкретных патогенов. Таким образом можно создать мультиэпитопную вакцину путем интеграции иммуногенетики и биоинформатики. Вакцины, разработанные *in silico* с помощью вычислительных методов, продемонстрировали эффективность, безопасность, специфичность и термодинамическую стабильность в различных исследованиях. Кроме того, эти конструкции предлагают эффективную по времени стратегию оценки, что позволяет оптимизировать процесс разработки. В настоящее время используется метод обратной вакцинологии для поиска новых химерных мультиэпитопных вакцин, представляющих собой рекомбинантные белки, состоящие из нескольких генетически слитых иммуногенных эпитопов клостридий, экспрессированных в *Escherichia coli* или другом микроорганизме. При таких разработках учитываются разнообразные взаимодействия с участием MHC I, MHC II и различных физико-химических параметров, а предложенные вакцины *in silico* подвергаются оценке на аллергенность, антигенность и токсичность [39].

Работа по созданию токсоидов CPA *C. perfringens* началась в 1930-х гг. Ряд исследований на животных моделях выявил, что иммунизация анатоксином может обеспечить защиту от газовой гангрены. Однако приготовление анатоксинов, которые были бы антигенными и защитными, оказалось серьезным препятствием для разработки вакцины, пригодной для широкомасштабной иммунизации войск. Следовательно, не было осуществлено полевых испытаний с вакцинами-кандидатами. Трудности в изготовлении постоянных партий вакцины могли стать одним из факторов, приведших к последующему снижению интереса к вакцинам для людей против газовой гангрены [29]. Однако современные методы генетики, молекулярной биологии и биоинформатики позволяют создать такую вакцину в наше время. Поэтому интересно рассмотреть и современные разработки прототипов вакцины против газовой гангрены для человека с использованием новейших методов.

Известно, что иммунизация нетоксичным С-концевым доменом CPA *C. perfringens* обеспечивала защиту мышей как от прямого летального действия токсина, так и от последующего заражения. Кроме того, иммунизация локализовала инфекцию и предотвратила ишемию стоп. Гистопатология продемонстрировала ограниченный некроз мышц, снижение тромбоза микрососудов и усиленный приток гранулоцитов у иммунизированных мышей. Авторы пришли к выводу, что активная иммунизация против С-концевого домена CPA является разумной стратегией предотвращения заболеваемости и смертности от газовой гангрены, вызванной *C. perfringens* [8].

Несколько исследований были посвящены использованию рекомбинантных вариантов CPA для вакцинации против газовой гангрены в первую очередь с точки зрения военнослужащих или биологической безопасности. Для получения нетоксичной версии CPA для вакцинации было использовано множество стратегий, наиболее распространенными из которых являются направленный мутагенез, выделение штаммов, которые естественным образом продуцируют нетоксичный CPA, экспрессия только N- или С-концевого домена, экспрессия химерных токсинов и экспрессия антигенов на поверхности спор *Bacillus subtilis* [25].

Домены CPA могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК в клетках *E. coli*. По отдельности эти домены нетоксичны, но иммуногенны для мышей и приводят к образованию антител. Показано, что С-концевой домен CPA является иммунопротекторным, а мутация гена *cpa* приводит к отсутствию способности бактерии вызывать клостридиальный мионекроз в мышиной модели [20, 41]. Изолированный С-концевой домен (247–370 а.о.) обладал высокой иммунозащитой у мышей. Мыши, иммунизированные этим обработанным формальдегидом рекомбинантным антигеном, были защищены CPA и от заражения дозой 10 LD_{50} *C. perfringens*. Напротив, мыши, иммунизированные эквивалентным количеством N-концевого ферментативного домена (1–249 а.о.), вырабатывали антитела, которые не защищали от токсина и заболевания. Эти результаты были подтверждены в более подробном исследовании вакцинации, которое также показало, что мыши, вакцинированные С-доменом, а затем подвергнутые воздействию модели инфекции, имели сниженный тромбоз и повышенный приток полиморфноядерных лейкоцитов в место инфекции [42].

Для дальнейшего определения иммунозащитной области С-домена эффективность нескольких рекомбинантных фрагментов (а.о. 251–370, 281–370 и 311–370) была исследована в модели активной вакцинации. Вакцинация фрагментами 251–370 и 281–370 защищала от CPA и от *C. perfringens*, тогда как фрагмент 311–370 давал лишь частичную защиту. Иммунизация мышей N- и С-концевыми доменами CPA-N (1–246 а.о.) и CPA-C (247–370 а.о.) показала, что CPA-C способен обеспечить иммунитет против заражения 50 мкг CPA или 10^9 клетками *C. perfringens*. Животные, инокулированные CPA-N, не были защищены от CPA. В совокупности эти результаты указывают на то, что блокирование связывания CPA с клеткой-хозяином является необходимым и достаточным для обеспечения иммунитета против этого токсина. Это исключает необходимость нейтрализации его ферментативной активности и делает С-концевой домен основным кандидатом на вакцину против CPA [25, 42].

Известно, что мутации CPA H68G, H148G/L, D56G и E152Q способны устранить его токсичность. В одном исследовании мутантный CPA D56N смог снизить агрегацию тромбоцитов, увеличив LD_{50} с 0,5 до 100 мкг/кг у мышей. Мутация T272P снижает токсичность CPA на 35%. Направленный мутагенез D336N, Y275N, D269N, Y331L, Y331F, Y307F и Y275F снизил гемолитическую активность на 11, 11, 19, 30, 36, 38 и 73% соответственно. Также идентифицирован природный нетоксичный вариант CPA (CPA-121A/91) с мутация-

ми M13V, A174N, T177A, H212R, P295Q, S335P, I345V и W360G. Этот вариант не проявлял гемолитической, фосфолипазной или сфингомиелиназной активности. Вакцинация CPA-121A/91 смогла продлить продолжительность жизни зараженных мышей, но не предотвратила смерть. Эти результаты дают представление о возможных эпитопах и важных участках действия токсина и могут оказаться полезными для разработки как защитных, так и терапевтических антител [25].

Считается, что антитела к С-концевому домену CPA предотвращают связывание токсина с мембранами клеток хозяина. Защита, по-видимому, распространяется на ряд форм токсина с вариантами последовательностей из различных штаммов *C. perfringens* и даже гомологов CPA, обнаруженных у *C. bifermentans* и *C. absonum*. Поэтому вакцина на основе С-домена CPA может обеспечить защиту от газовой гангрены, вызываемой несколькими видами клостридий [29].

В работе [43] проведен компьютерный анализ протеома *C. perfringens* и выявлены высокоиммуногенные белки, домены и эпитопы. Показано, что белками с наибольшей плотностью иммуногенных эпитопов являются коллагеназа А, экзо-α-сиалидаза, α-N-ацетилглюкозаминидаза и гиалуронидаза, которые могут стать потенциальными кандидатами для рекомбинантной вакцины. Выявлено, что нетоксичный домен PFO богат эпитопами цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов. Этот домен можно использовать в качестве потенциальной субъединичной вакцины для борьбы с газовой гангреной [43].

Была проведена оценка иммунизирующей способности CPA *C. perfringens*, вводимого перорально с помощью пробиотической вакцины на основе *Lactobacillus casei* [44]. Штамм *L. casei* LC-α протестирован в качестве нетоксичного кандидата на пероральную вакцину на мышиной модели против заражения CPA. В качестве последовательности CPA использовали С-концевой домен. Генетически модифицированные клетки LC-α защищали мышей от воздействия CPA, по меньшей мере 30-кратно превышающего минимальную летальную дозу.

Результаты показали, что вакцина на основе LC-α может вызывать повышение уровня анти-CPA IgG и IgA антител в сыворотках крови иммунизированных мышей ($p < 0,05$). Уровень антител у мышей коррелировал с увеличением их выживаемости, подтверждая представление о том, что гуморальные иммунные реакции имеют решающее значение для защиты. Эти данные свидетельствуют о том, что данная рекомбинантная векторная вакцина является потенциальным кандидатом против газовой гангрены [44].

Описан пробиотик на основе штамма *B. subtilis*, который был генетически модифицирован и способен продуцировать в клетках или на поверхности спор фрагмент CPA. У мышей, иммунизированных такими спорами, выработался иммунитет, и они были защищены от смертельных доз токсина. Этот подход обеспечил защиту только от одного токсина, но его можно было бы распространить и на другие токсины. Использование спор в качестве носителя и средства доставки обеспечивает стабильность вакцины, которую можно легко производить в больших объемах [23].

Также сообщалось об успешном экспериментальном применении тетравалентных рекомбинантных вакцин на основе CPA, CPB, ETX и NetB. Эти исследования показали, что многовалентные рекомбинантные вакцины могут быть более эффективны по сравнению с традиционными вакцинами при иммунизации животных, а также иметь перспективы разработки аналогичных вакцин и для людей [24]. Однако рекомбинантные вакцины против ETX получили гораздо меньше внимания, чем вакцины против CPA [29].

В настоящее время в ветеринарии используются вакцины против энтеротоксемии, вызванной ETX, основанные на фильтратах бактериальных культур, инактивированных формальдегидом [33, 35]. Существует и лошадиный антитоксин, одобренный только для применения в ветеринарии [32]. Известно также, что пероральное введение ε-токсоида или β-токсоида, экспрессируемого *L. casei*, вызывало эффективный гуморальный иммунный ответ на токсин на животных моделях [23]. А антитела человеческого или животного происхождения, вводимые аэрозолем или внутривенно, могут быть использованы в качестве профилактического и лечебного средства против ETX [31]. Однако до настоящего времени не разработано эффективной вакцины против ETX для человека.

Были созданы прототипы рекомбинантных вакцин против ETX. Например, описан прототип комбинированной вакцины, содержащей рекомбинантный слитый белок, состоящий из мутантного ETX (замена 106-й аминокислоты гистидина на пролин, ETX H106P) и холерного токсина, а также отдельный рекомбинантный мутантный белок ETX (замена 196-й аминокислоты, ETX Y196E). При этом данные белки были смешаны с различными адъювантами. При испытании на кроликах данный препарат показал сильный иммунный ответ и может являться потенциальным кандидатом в вакцинные препараты против ETX [45].

В качестве потенциальных вакцин также были разработаны другие генетически детоксифицированные мутанты ETX. ETX H106P нетоксичен и признан безопасным для разработки вакцинного антигена против энтеротоксемии. Мыши, вакцинированные рекомбинантной С-концевой областью ETX Y196E, демонстрировали защиту после введения 500х $ЛД_{50}$. [45]. А мутантные рекомбинантные белки mETX F199E и mETX H106P защищали иммунизированных мышей от дозы ETX 100 LD_{50}. Эти мутанты обладали низкой или нулевой цитотоксичностью и сохраняли иммуногенность, что позволяет использовать их в качестве кандидатов. Кроме того, иммунизированная сыворотка обеспечивала эффективную пассивную защиту при совместном введении мышам смеси иммунизированной сыворотки и 10 LD_{50} рекомбинантного ETX [33]. Таким образом, точечные мутации ETX могут значительно снизить токсичность этого токсина, и, следовательно, он может стать основой для создания вакцины. Однако утверждается, что полностью устранить его токсичность невозможно [37].

Известно о вакцине на основе наночастиц MNP (membrane-camouflaged nanoparticles), инкапсулированных в клеточную мембрану, которая содержала адсорбированный рекомбинантный белок ETX, слитый с белком Onchocerca volvulus (1Ov-ASP-1) с таргетным действием на В-клетки (ASP-ETX), а также содержала мутантный аттенуированный белок ETX Y196E. Слитый белок обладал порообразующей активностью и способностью нацеливаться на В-клетки. Наночастицы

MNP использовали для адсорбции рекомбинантного токсина ASP-ETX и мутантного ETX Y196E с целью создания новой вакцины против ETX, способной воздействовать на В-клетки и обладающей хорошей иммуногенностью. Вакцина стимулировала иммунный ответ Th1 и Th2. Однако защитный эффект вакцины на основе наночастиц был немного слабее, чем у вакцины ETXY196E с добавлением адъюванта. Полученные данные свидетельствуют о том, что MNP-ASP-ETX можно рассматривать как новую вакцину для профилактики отравления ETX, а также открывают новые возможности для разработки вакцин против других токсинов [37].

Однако, несмотря на все перечисленные многообещающие исследования, в настоящее время не существует коммерческой вакцины против *C. perfringens* для человека [20]. Хотя существуют вакцины для различных видов *Clostridium*, например для *C. tetani* и *C. botulinum*, в настоящее время нет предназначенной для людей вакцины против *C. septicum*.

Известно, что для производства вакцины против *C. septicum* для животных штаммы культивируют в анаэробных условиях, а затем инактивируют формальдегидом при 37°C [24]. Существуют несколько способов создания вакцины против *C. septicum* для человека – например, с использованием инактивированных антигенов без адъювантов или токсоидов (анатоксинов), инактивированных химической либо термической обработкой токсинов, токсичность которых подавлена, в то время как иммуногенность сохраняется [39].

Известно, что α-токсин *C. septicum* был выделен, концентрирован, очищен и инактивирован формалином, а полученный токсоид защищал морских свинок от спор *C. septicum*. Была также разработана экспериментальная рекомбинантная α-токсиновая вакцина. Иммуноферментный анализ и результаты заражения показали более высокие концентрации антител, чем у нативной вакцины [24].

С помощью субтрактивной протеомики были определены антигенные мембранные белки, включая факторы вирулентности и резистентности *C. septicum*. Авторы идентифицировали эпитопы MHC I, II и B-клеток. Эти эпитопы были дополнительно исследованы *in silico* для оценки их иммуногенности, антигенности, аллергенности, консервантности и токсичности. Выбранные иммуногенные эпитопы были включены в химерную субъединичную вакцину, дополненную иммуномодулирующими адъювантами и другими дополнительными аминокислотными последовательностями. Полученная конструкция вакцины была *in silico* проанализирована на предмет ее взаимодействия с молекулами MHC и комплексом TLR4/MD2. Анализ определил жгутиковый белок FliR как перспективную мишень для вакцины на основе системного скрининга протеома *C. septicum*. Используя подход обратной вакцинологии, авторы также идентифицировали 11 эпитопов MHC I, 19 MHC II и 33 B-клеточных эпитопа. Однако эффективность сконструированной путем математического моделирования вакцины в предотвращении инфекции требует проверки с помощью иммуноанализов *in vitro* и *in vivo* и исследований направленного мутагенеза [39].

Для вакцины против *C. novyi* для животных получали бактерин-токсин путем культивирования штаммов *C. novyi* и инактивации TcnA формальдегидом. Также TcnA *C. novyi* типа B был очищен, инактивирован формальдегидом, смешан с фосфатом алюминия в качестве адъюванта, а затем введен морским свинкам. Эффективность защиты от TcnA оценивали путем заражения спорами *C. novyi* типа B. Результаты показали, что такая вакцина обеспечивала защиту от заражения у морских свинок. Водно-масляная наноэмульсия, содержащая концентрированный и инактивированный формалином TcnA *C. novyi* типа B, показала эффективность при заражении иммунизированных мышей TcnA [24].

Было также разработано и оценено несколько экспериментальных рекомбинантных вакцин против TcnA *C. novyi* с использованием иммунологических методов. Результаты показали, что антитела, вырабатываемые против рекомбинантных белков, были более эффективны, чем антитела против токсина [24].

Биоинформатические и молекулярно-биологические исследования TcnA *C. novyi* путем поиска и идентификации наиболее антигенных областей показали, что распознавание небольшого фрагмента TcnA с высокой аффинностью может вызывать более сильный иммунный ответ, чем целый антиген. Таким образом, биоинформатические инструменты могут повысить шансы на создание высокоантигенных вакцин [24].

В целом в настоящее время вакцины на основе рекомбинантных белков представляются наиболее перспективными кандидатами благодаря сокращению трудоемких работ и множества этапов культивирования. Производство рекомбинантных вакцин против клостридиальных инфекций рассматривается как нетоксичный, высокоэффективный процесс с превосходной стабильностью и биобезопасностью, а также относительно низкой стоимостью производства и отсутствием серьезных побочных эффектов, в отличие от аттенуированных вакцин [43]. Однако для введения очищенных рекомбинантных анатоксинов по-прежнему необходимы адъюванты для индукции иммунной системы хозяина [24].

Заключение

Анализ литературы показал, что в настоящее время газовая гангрена по-прежнему является актуальной раневой инфекцией с высокой летальностью. Основные ее возбудители – *C. perfringens*, *C. septicum*, *C histolyticum*, *C. sordellii* и *C. novyi*. Их токсины, такие как α-токсин, перфринголизин О, и др., представляют высокую опасность, в особенности ε-токсин *C. perfringens*, несмотря на то, что механизм действия и молекулярная структура клостридиальных токсинов хорошо изучены. Споры клостридий обладают высокой устойчивостью и повсеместно распространены в природе. В связи с этим знания о возбудителях газовой гангрены и их токсинах имеют большое значение для обеспечения биологической безопасности страны. Однако в настоящее время не существует лицензированной вакцины против возбудителей газовой гангрены или их токсинов для человека.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Funding

The work was carried out within the framework of the federal project "Sanitary shield of the country – safety for health (prevention, detection, response)".

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Mehdizadeh Gohari I, A Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. Virulence. 2021 Dec;12(1):723-753. DOI: 10.1080/21505594.2021.1886777
2. Wells CL, Wilkins TD. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In: Baron S, ed. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 18.
3. Barras V, Greub G. History of biological warfare and bioterrorism. Clin Microbiol Infect. 2014 Jun;20(6):497-502. DOI: 10.1111/1469-0691.12706
4. Kellett CE. The Early History of Gas Gangrene. Ann Med Hist. 1939 Sep;1(5):452-459.
5. Цвелев ЮВ, Остроменский ВВ. К 500-летию со дня рождения. Амбруаз Парэ (Ambroise Paré, 1510–1590). Ж. акуш. и жен. болезн. 2010;LIX(3):122-128.
6. Соленов ВВ. Современное хирургическое лечение газовой гангрены. Вклад Н.И.Пирогова. Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. 2018;4(3(22)):47-51.
7. Жевлакова ЮА, Хохлова ОИ, Семенихина ВМ, Устьянцева ИМ. Диагностика анаэробной инфекции, вызванной *Clostridium perfringens*, у пациента с посттравматической флегмоной (клинический случай). Клиническая лабораторная диагностика. 2013;6:51-53.
8. Stevens DL, Aldape MJ, Bryant AE. Life-threatening clostridial infections. Anaerobe. 2012 Apr;18(2):254-9. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.11.001
9. Туманов АС, Дармов ИВ, Бакулин МК, Лещенко АА, Шаров ДА, Багин СВ, и др. Вклад советских военных микробиологов в Великую Победу. Вестник войск РХБ защиты. 2025;9(2):170-185. DOI: 10.35825/2587-5728-2025-9-2-170-185
10. Тучик ЕС, Лядова МВ, Колударова ЕМ. Ошибки при определении причинно-следственной связи последствий оказания медицинской помощи пациенту с травмой верхней конечности, осложненной газовой гангреной. Медицинский вестник МВД. 2025;138(5):90-95. DOI: 10.52341/20738080_2025_138_5_90
11. Гололобов АМ, Мельников ВВ, Топчиев МА, Паршин ДС. Лечение анаэробной флегмоны верхней конечности, вызванной *Clostridium perfringens*, применением оксигенированного препарата. Сибирское медицинское обозрение. 2021;(3):107-112. DOI: 10.20333/25000136-2021-3-107-112
12. Hamid S, Gadré A, Fornander L, Sjöwall J, Muhrbeck M. *Clostridium septicum* myonecrosis following gardening: A case report. Int J Surg Case Rep. 2023 Apr;105:108000. DOI: 10.1016/j.ijscr.2023.108000
13. Бруклич НА, Лапшин АВ, Нерсесян ЕГ, Цитронов ЕС. Газовая гангрена печени как проявление эндогенного клостридиального сепсиса. Вестник хирургии им. И.И.Грекова. 2012;171(1):67-69.
14. Мельцин ИИ, Никитенко ВИ, Афуков ИВ, Котлубаев РС, Арестова СВ, Куркин АП, и др. Клинический случай открытого перелома обеих костей предплечья, осложненного анаэробной клостридиальной инфекцией, газовой гангреной смешанной формы, у ребенка 11 лет. Детская хирургия. 2014;18(5):51-52.
15. Мукашев МШ, Турганбаев АЭ, Айтмырзаев БН, Асанов БА, Токтосун УБ. Диагностические ошибки при очевидной ясности диагноза и тактические ошибки при оказании медицинской помощи со смертельным исходом пациента (экспертный случай). ЕЖЗ. 2019 янв;5(5-6):154-162.
16. Комаровская ЕИ, Перелыгина ОВ. Современная ситуация по заболеваемости отдельными клостридиальными инфекциями: газовая гангрена и столбняк. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021;21(1):31-38. DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-1-31-38
17. Пильников СА. Войновский АЕ. Анаэробная инфекция при минно-взрывной травме конечностей. Вестник НМХЦ им. Н.И.Пирогова. 2020;15(3-2):68-76. DOI: 10.25881/BPNMSC.2020.31.31.013
18. Powell JW. Japan's germ warfare: The U.S. cover-up of a war crime. Bulletin of Concerned Asian Scholars. 1980 Jul;12(4):2-17. DOI: 10.1080/14672715.1980.10405225
19. Turban A, Joussellin V, Piau C, Cattoir V, Launey Y, Eustache G. Fatal *Clostridium septicum* gas gangrene complicating ECMO: case report and review of literature. Access Microbiol. 2024 Aug 5;6(8):000825.v3. DOI: 10.1099/acmi.0.000825.v3
20. Junior CAO, Silva ROS, Lobato FCF, Navarro MA, Uzal FA. Gas gangrene in mammals: a review. J Vet Diagn Invest. 2020 Mar;32(2):175-183. DOI: 10.1177/1040638720905830
21. Галкин ДВ, Кречикова ОИ, Сухорукова МВ, Дехнич АВ. Современные возможности терапии анаэробных инфекций. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2006;8(4):298-313.
22. Лобзин ЮВ, Кветная АС, Скрипченко НВ, Железова ЛИ. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(1):91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37
23. Cruz KCP, Enekegho LO, Stuart DT. Bioengineered Probiotics: Synthetic Biology Can Provide Live Cell Therapeutics for the Treatment of Foodborne Diseases. Front Bioeng Biotechnol. 2022 May 17;10:890479. DOI: 10.3389/fbioe.2022.890479
24. Abdolmohammadi Khiav L, Zahmatkesh A. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. Trop Anim Health Prod. 2021 Apr 23;53(2):284. DOI: 10.1007/s11250-021-02728-w
25. Ferreira MR, Moreira GM, Cunha CE, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira A, et al. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. Toxins (Basel). 2016 Nov 21;8(11):340. DOI: 10.3390/toxins8110340

26. Duracova M, Klimentova J, Myslivcova Fucikova A, Zidkova L, Sheshko V, Rehulkova H, et al. Targeted Mass Spectrometry Analysis of *Clostridium perfringens* Toxins. Toxins (Basel). 2019 Mar 23;11(3):177. DOI: 10.3390/toxins11030177
27. Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. Future Microbiol. 2014;9(3):361-77. DOI: 10.2217/fmb.13.168
28. Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, Pardon B, Timbermont L, Haesebrouck F, et al. Perfringolysin O: The Underrated *Clostridium perfringens* Toxin? Toxins (Basel). 2015 May 14;7(5):1702-21. DOI: 10.3390/toxins7051702
29. Titball RW. *Clostridium perfringens* vaccines. Vaccine. 2009 Nov 5;27 Suppl 4:D44-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.047
30. Wang G, Liu H, Gao Y, Niu X, Deng X, Wang J, et al. Piceatannol Alleviates *Clostridium perfringens* Virulence by Inhibiting Perfringolysin O. Molecules. 2022 Aug 12;27(16):5145. DOI: 10.3390/molecules27165145
31. Alves GG, Machado de Ávila RA, Chávez-Olórtegui CD, Lobato FC. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. Anaerobe. 2014 Dec;30:102-7. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.08.016
32. Berger T, Eisenkraft A, Bar-Haim E, Kassirer M, Aran AA, Fogel I. Toxins as biological weapons for terror-characteristics, challenges and medical countermeasures: a mini-review. Disaster Mil Med. 2016 Apr 29;2:7. DOI: 10.1186/s40696-016-0017-4
33. Li Q, Xin W, Gao S, Kang L, Wang J. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ε-toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia. Hum Vaccin Immunother. 2013 Nov;9(11):2386-92. DOI: 10.4161/hv.25649
34. Janik E, Ceremuga M, Saluk-Bijak J, Bijak M. Biological Toxins as the Potential Tools for Bioterrorism. Int J Mol Sci. 2019 Mar 8;20(5):1181. DOI: 10.3390/ijms2005118
35. Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, Iandolo JJ, Jackson R, Slater LN, et al. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. Am J Med Sci. 2002 Jun;323(6):326-40. DOI: 10.1097/00000441-200206000-00005
36. Xu J, Li D, Kang L, Liu T, Huang J, Li J, et al. Systematic evaluation of membrane-camouflaged nanoparticles in neutralizing *Clostridium perfringens* ε-toxin. J Nanobiotechnology. 2023 Mar 17;21(1):95. DOI: 10.1186/s12951-023-01852-z
37. Li D, Tang L, Fang X, Liu T, Luo X, Li J, et al. Combined ε-Toxin Nanovaccine with Enhanced Immunity for Effective Protection in a Murine Model. Int J Nanomedicine. 2025 Nov 18;20:13817-13835. DOI: 10.2147/IJN.S530074
38. Cole AR, Gibert M, Popoff M, Moss DS, Titball RW, Basak AK. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. Nat Struct Mol Biol. 2004 Aug;11(8):797-8. DOI: 10.1038/nsmb804
39. Hassan Khanzada M, Khan A, Khan K, Jalal K, Aghayeva S, Uddin R. A reverse vaccinomics approach for the designing of novel immunogenic multi-epitope vaccine construct against gas gangrene and related colorectal cancer for *Clostridium septicum* DSM 7534. Hum Immunol. 2024 Nov;85(6):111169. DOI: 10.1016/j.humimm.2024.111169
40. Андрюков БГ, Капенко АА, Ляпун ИН. Обучаясь у природы: бактериальные споры как мишень для современных технологий в медицине (обзор). Современные технологии в медицине. 2021;12(3):105-122. DOI: 10.17691/stm2020.12.3.13
41. Boyd NA, Thomson RO, Walker PD. The prevention of experimental *Clostridium novyi* and *Cl. perfringens* gas gangrene in high-velocity missile wounds by active immunisation. J Med Microbiol. 1972 Nov;5(4):467-72. DOI: 10.1099/00222615-5-4-467
42. Nagahama M, Takehara M, Rood JI. Histotoxic Clostridial Infections. Microbiol Spectr. 2019 Jul 26;7(4):10.1128/microbiolspec.gpp3-0024-2018.
43. Soto LF, Romaní AC, Jiménez-Avalos G, Silva Y, Ordinola-Ramirez CM, Lopez Lapa RM, et al. Immunoinformatic analysis of the whole proteome for vaccine design: An application to *Clostridium perfringens*. Front Immunol. 2022 Aug 30;13:942907. DOI: 10.3389/fimmu.2022.942907
44. Alimolaei M, Golchin M, Abshenas J, Ezatkhah M, Bafti MS. A Recombinant Probiotic, *Lactobacillus casei*, Expressing the *Clostridium perfringens* α-toxoid, as an Orally Vaccine Candidate Against Gas Gangrene and Necrotic Enteritis. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018 Jun;10(2):251-257. DOI: 10.1007/s12602-017-9276-8
45. Peng X, Li X, Peng G, Feng L, Jiang Y, Luo Y. Recombinant unpurified rETXH106P/CTB-rETXY196E protects rabbits against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. J Vet Med Sci. 2021 Apr 3;83(3):441-446. DOI: 10.1292/jvms.20-0385

References

1. Mehdizadeh Gohari I, A Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. Virulence. 2021 Dec;12(1):723-753. DOI: 10.1080/21505594.2021.1886777
2. Wells CL, Wilkins TD. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In: Baron S, ed. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 18.
3. Barras V, Greub G. History of biological warfare and bioterrorism. Clin Microbiol Infect. 2014 Jun;20(6):497-502. DOI: 10.1111/1469-0691.12706
4. Kellett CE. The Early History of Gas Gangrene. Ann Med Hist. 1939 Sep;1(5):452-459.
5. Tsvelyov YuV, Ostromensky VV. Ambroise Paré, 1510–1590. To the 500 Anniversary. J of Obstetrics and Women's Diseases. 2010;LIX(3):122-128.
6. Solenov VV. Modern surgery treatment of the gas gangrene. Contribution of N.I.Pirogov. Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region. 2018;4(3(22)):47-51. (In Russian)
7. Jevlakova YuA, Khokhlova OI, Semenikhina VM, Ustiyantseva IM. The diagnosis of anaerobic infection induced by *Clostridium perfringens* in a patient with post-traumatic phlegmon: A clinical case. Clinical Laboratory Diagnostics. 2013;6:51-53. (In Russian).
8. Stevens DL, Aldape MJ, Bryant AE. Life-threatening clostridial infections. Anaerobe. 2012 Apr;18(2):254-9. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.11.001
9. Tumanov AS, Darmov IV, Bakulin MK, Leshchenko AA, Sharov DA, Bagin SV, et al. The Soviet Military Microbiologists' Contribution to the Victory in the Great Patriotic War. Journal of NBC Protection Corps. 2025;9(2):170-185. DOI: 10.35825/2587-5728-2025-9-2-170-185 (In Russian).
10. Tuchik ES, Lyadova MV, Koludarova EM. Errors in determining the cause-and-effect relationship of the consequences of providing medical care to a patient with an upper limb injury complicated by gas gangrene. Medical Bulletin of the Ministry of Internal Affairs. 2025;138(5):90-95. DOI: 10.52341/20738080_2025_138_5_90 (In Russian).
11. Gololobov AM, Melnikov VV, Topchiev MA, Parshin DS. Treatment of anaerobic phlegmon of the upper extremity induced by *Clostridium perfringens* via application of an oxygenated pharmaceutical. Siberian Medical Review. 2021;(3):107-112. DOI: 10.20333/25000136-2021-3-107-112 (In Russian).
12. Hamid S, Gadré A, Fornander L, Sjöwall J, Muhrbeck M. *Clostridium septicum* myonecrosis following gardening: A case report. Int J Surg Case Rep. 2023 Apr;105:108000. DOI: 10.1016/j.ijscr.2023.108000
13. Bruklich NA, Lapshin AV, Nersesyan EG, Tsitronov ES. Gas gangrene of the liver as a manifestation of endogenous clostridial sepsis. Bulletin of Surgery n.a. I.I.Grekov. 2012;171(1):67-69. (In Russian).
14. Meltsin II, Nikitenko VI, Afukov IV, Kotlubaev RS, Arestova SV, Kurkin AP, et al. A clinical case of open fracture of both forearm bones complicated by anaerobic clostridial infection and mixed gas gangrene in an 11-year-old child. Pediatric Surgery. 2014;18(5):51-52. (In Russian).
15. Mukashev MSh, Turganbaev AE, Aytmyrzaev BA, Asanov BA, Toktosun UB. Diagnostic errors with obvious clarity of diagnosis and tactical errors in provision of medical care with the patients death (expert case). The Eurasian Journal of Healthcare. 2019 Jan;5(5-6):154-162. (In Russian).

16. Komarovskaya EI, Perelygina OV. Current incidence of certain clostridial infections: gas gangrene and tetanus. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie (BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment). 2021;21(1):31-38. DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-1-31-38 (In Russian).
17. Pilnikov SA, Vojnovskij AE. Anaerobic infection in mine-explosive injury of the extremities. Bulletin of the N.I.Pirogov National Medical and Surgical Center. 2020;15(3-2):68-76. DOI: 10.25881/BPNMSC.2020.31.31.013 (In Russian).
18. Powell JW. Japan's germ warfare: The U.S. cover-up of a war crime. Bulletin of Concerned Asian Scholars. 1980 Jul;12(4):2-17. DOI: 10.1080/14672715.1980.10405225
19. Turban A, Joussellin V, Piau C, Cattoir V, Launey Y, Eustache G. Fatal *Clostridium septicum* gas gangrene complicating ECMO: case report and review of literature. Access Microbiol. 2024 Aug 5;6(8):000825.v3. DOI: 10.1099/acmi.0.000825.v3
20. Junior CAO, Silva ROS, Lobato FCF, Navarro MA, Uzal FA. Gas gangrene in mammals: a review. J Vet Diagn Invest. 2020 Mar;32(2):175-183. DOI: 10.1177/1040638720905830
21. Galkin DV, Kretchikova OI, Sukhorukova MV, Dekhnich AV. Current State of Anti-Anaerobic Therapy. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2006;8(4):298-313. (In Russian).
22. Lobzin YuV, Kvetnaya AS, Skripchenko NV, Zhelezova LI. Current notions about etiopathogenetic and genetic specific features of Clostridium perfringens toxins. Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology. 2021;98(1):91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37 (In Russian).
23. Cruz KCP, Enekegho LO, Stuart DT. Bioengineered Probiotics: Synthetic Biology Can Provide Live Cell Therapeutics for the Treatment of Foodborne Diseases. Front Bioeng Biotechnol. 2022 May 17;10:890479. DOI: 10.3389/fbioe.2022.890479
24. Abdolmohammadi Khiav L, Zahmatkesh A. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. Trop Anim Health Prod. 2021 Apr 23;53(2):284. DOI: 10.1007/s11250-021-02728-w
25. Ferreira MR, Moreira GM, Cunha CE, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira A, et al. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. Toxins (Basel). 2016 Nov 21;8(11):340. DOI: 10.3390/toxins8110340
26. Duracova M, Klimentova J, Myslivcova Fucikova A, Zidkova L, Sheshko V, Rehulkova H, et al. Targeted Mass Spectrometry Analysis of *Clostridium perfringens* Toxins. Toxins (Basel). 2019 Mar 23;11(3):177. DOI: 10.3390/toxins11030177
27. Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. Future Microbiol. 2014;9(3):361-77. DOI: 10.2217/fmb.13.168
28. Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, Pardon B, Timbermont L, Haesebrouck F, et al. Perfringolysin O: The Underrated *Clostridium perfringens* Toxin? Toxins (Basel). 2015 May 14;7(5):1702-21. DOI: 10.3390/toxins7051702
29. Titball RW. *Clostridium perfringens* vaccines. Vaccine. 2009 Nov 5;27 Suppl 4:D44-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.047
30. Wang G, Liu H, Gao Y, Niu X, Deng X, Wang J, et al. Piceatannol Alleviates *Clostridium perfringens* Virulence by Inhibiting Perfringolysin O. Molecules. 2022 Aug 12;27(16):5145. DOI: 10.3390/molecules27165145
31. Alves GG, Machado de Ávila RA, Chávez-Olórtegui CD, Lobato FC. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. Anaerobe. 2014 Dec;30:102-7. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.08.016
32. Berger T, Eisenkraft A, Bar-Haim E, Kassirer M, Aran AA, Fogel I. Toxins as biological weapons for terror-characteristics, challenges and medical countermeasures: a mini-review. Disaster Mil Med. 2016 Apr 29;2:7. DOI: 10.1186/s40696-016-0017-4
33. Li Q, Xin W, Gao S, Kang L, Wang J. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ε-toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia. Hum Vaccin Immunother. 2013 Nov;9(11):2386-92. DOI: 10.4161/hv.25649
34. Janik E, Ceremuga M, Saluk-Bijak J, Bijak M. Biological Toxins as the Potential Tools for Bioterrorism. Int J Mol Sci. 2019 Mar 8;20(5):1181. DOI: 10.3390/ijms2005118
35. Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, Iandolo JJ, Jackson R, Slater LN, et al. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. Am J Med Sci. 2002 Jun;323(6):326-40. DOI: 10.1097/00000441-200206000-00005
36. Xu J, Li D, Kang L, Liu T, Huang J, Li J, et al. Systematic evaluation of membrane-camouflaged nanoparticles in neutralizing *Clostridium perfringens* ε-toxin. J Nanobiotechnology. 2023 Mar 17;21(1):95. DOI: 10.1186/s12951-023-01852-z
37. Li D, Tang L, Fang X, Liu T, Luo X, Li J, et al. Combined ε-Toxin Nanovaccine with Enhanced Immunity for Effective Protection in a Murine Model. Int J Nanomedicine. 2025 Nov 18;20:13817-13835. DOI: 10.2147/IJN.S530074
38. Cole AR, Gibert M, Popoff M, Moss DS, Titball RW, Basak AK. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. Nat Struct Mol Biol. 2004 Aug;11(8):797-8. DOI: 10.1038/nsmb804
39. Hassan Khanzada M, Khan A, Khan K, Jalal K, Aghayeva S, Uddin R. A reverse vaccinomics approach for the designing of novel immunogenic multi-epitope vaccine construct against gas gangrene and related colorectal cancer for *Clostridium septicum* DSM 7534. Hum Immunol. 2024 Nov;85(6):111169. DOI: 10.1016/j.humimm.2024.111169
40. Andryukov BG, Karpenko AA, Lyapun IN. Learning from Nature: Bacterial Spores as a Target for Current Technologies in Medicine (Review). Sovrem. tekhnologii med. 2021;12(3):105-122. DOI: 10.17691/stm2020.12.3.13 (In Russian)
41. Boyd NA, Thomson RO, Walker PD. The prevention of experimental *Clostridium novyi* and *Cl. perfringens* gas gangrene in high-velocity missile wounds by active immunisation. J Med Microbiol. 1972 Nov;5(4):467-72. DOI: 10.1099/00222615-5-4-467
42. Nagahama M, Takehara M, Rood JI. Histotoxic Clostridial Infections. Microbiol Spectr. 2019 Jul 26;7(4):10.1128/microbiolspec.gpp3-0024-2018.
43. Soto LF, Romaní AC, Jiménez-Avalos G, Silva Y, Ordinola-Ramirez CM, Lopez Lapa RM, et al. Immunoinformatic analysis of the whole proteome for vaccine design: An application to *Clostridium perfringens*. Front Immunol. 2022 Aug 30;13:942907. DOI: 10.3389/fimmu.2022.942907
44. Alimolaei M, Golchin M, Abshenas J, Ezatkhah M, Bafti MS. A Recombinant Probiotic, *Lactobacillus casei*, Expressing the *Clostridium perfringens* α-toxoid, as an Orally Vaccine Candidate Against Gas Gangrene and Necrotic Enteritis. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018 Jun;10(2):251-257. DOI: 10.1007/s12602-017-9276-8
45. Peng X, Li X, Peng G, Feng L, Jiang Y, Luo Y. Recombinant unpurified rETXH106P/CTB-rETXY196E protects rabbits against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. J Vet Med Sci. 2021 Apr 3;83(3):441-446. DOI: 10.1292/jvms.20-0385

Информация о соавторах:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, заместитель директора по аналитической работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9501-1380

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1078-4585

Information about co-authors:

Vitaly S. Timofeev, PhD in Biological Sciences, Deputy Director for Analytical Work, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9501-1380

Ivan A. Dyatlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1078-4585

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 122–131
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 122–131

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-122-131

Пути совершенствования диагностики возбудителя туляремии

Т.Ю.Кудрявцева, А.Н.Мокриевич, Г.М.Титарева, А.А.Горбатов

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

Совершенствование диагностики туляремии продолжается с целью: 1) как можно более раннего выявления вида *Francisella tularensis* для постановки диагноза и начала соответствующего лечения; 2) поиска источника заражения, особенно при эпидемическом развитии инфекции; 3) получения представления о геномном разнообразии семейства *Francisellaceae*; 4) выявления среди представителей окружающей среды еще не изученных должным образом, предположительно не культивируемых видов бактерий семейства. В связи с этими целями продолжается поиск уникальных последовательностей для различных видов семейства, филогенетических линий внутри вида и конкретных эпидемических штаммов. Основные цели диагностики требуют различного подхода. В случае клинической диагностики необходимо как можно более раннее и чувствительное обнаружение консервативных последовательностей генома вида *F. tularensis*. В случае эпидемиологического расследования, наоборот, требуется выявление отличий в геномах эпидемического и близкородственных штаммов. В обзоре перечислены методы индикации и идентификации туляремийного микроба, а также их особенности, связанные с необходимостью выделения чистой культуры, риском заражения этой особо опасной инфекцией, чувствительностью, специфичность и трудоемкостью исследований. К настоящему времени семейство *Francisellaceae* включает 9 родов, в т.ч. 4 рода, входящих в группу «близкородственных» *Francisella*. В обзоре приведена информация о 6 геномных участках, уникальных для вида *F. tularensis*, патогенного для человека. Представлены 3 тест-системы полимеразной цепной реакции в реальном времени для исключения близкородственных родов и видов. Продолжается разработка методов с пределом обнаружения не только единичных молекул нуклеиновых кислот, но и части геномного эквивалента бактерии *F. tularensis* для выявления в крови, продуктах, сточных водах. Основными актуальными проблемами диагностики туляремии остаются повышение чувствительности тест-систем, полное исключение неспецифических реакций и создание экспресс-методов.

Ключевые слова: Francisella tularensis, индикация, идентификация штаммов, полимеразная цепная реакция, консервативные последовательности генома, олигонуклеотиды

Для цитирования: Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Титарева Г.М., Горбатов А.А. Пути совершенствования диагностики возбудителя туляремии. Бактериология. 2026; 11(3): 122–131. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-122-131

Ways to improve the diagnosis of the tularemia pathogen

T.Yu.Kudryavtseva, A.N.Mokrievich, G.M.Titareva, A.A.Gorbatov

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

Efforts to improve tularemia diagnostics continue with the aim of: 1) detecting the *Francisella tularensis* species as early as possible to establish a diagnosis and initiate appropriate treatment; 2) identifying the source of infection, particularly during outbreaks; 3) gaining insight into the genomic diversity of the *Francisellaceae* family; and 4) identifying among environmental samples previously unstudied and presumably non-culturable bacterial species belonging to this family. In pursuit of these goals, research continues to identify unique sequences specific to various family members, phylogenetic lineages within the species, and particular epidemic strains. These diagnostic objectives require distinct approaches. Clinical diagnostics necessitate the early and highly sensitive detection of conserved genomic sequences of *F. tularensis*. Conversely, epidemiological investigations require the identification of genomic differences between epidemic strains and closely related ones. This review outlines methods for the detection and identification of the tularemia pathogen, discussing their specific characteristics regarding the need for pure culture isolation, the risk of infection with this highly hazardous pathogen, and factors such as sensitivity, specificity, and labor intensity. To date, the *Francisellaceae* family comprises nine genera, including four that belong to the group of *Francisella*-related organisms. The review presents information on six genomic regions unique to the human-pathogenic species *F. tularensis* and describes three real-time PCR test systems designed to rule out closely related genera and species. Method development is ongoing to achieve detection limits capable of identifying not only single nucleic acid molecules but also fractions of the *F. tularensis* genome equivalent in samples such as blood, food products, and

Для корреспонденции:

Кудрявцева Тамара Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
E-mail: kudryavtseva@obolensk.org
ORCID: 0000-0003-0707-2376

Статья поступила 01.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Tamara Yu. Kudryavtseva, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Plague Microbiology of the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
E-mail: kudryavtseva@obolensk.org
ORCID: 0000-0003-0707-2376

The article was received 01.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

wastewater. The key current challenges in the diagnosis of tularemia remain increasing the sensitivity of test systems, completely eliminating non-specific reactions, and developing rapid testing methods.
Key words: Francisella tularensis, detection, strain identification, polymerase chain reaction, conserved genome sequences, oligonucleotides

For citation: Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N., Titareva G.M., Gorbatov A.A. Ways to improve the diagnosis of the tularemia pathogen. Bacteriology. 2026; 11(3): 122–131. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-122-131

Цели совершенствования диагностики туляремии. Основными целями совершенствования диагностики туляремии являются как можно более раннее выявление бактерии *Francisella tularensis* для постановки диагноза и начала соответствующего лечения, а также поиск источника заражения, особенно при эпидемическом развитии инфекции. В случае туляремии и то и другое до сих пор является нерешенной задачей. Причина в том, что клиническая картина заболевания разнообразна и зависит от ворот проникновения в организм инфекции, а при эпидемии источником зооноза могут быть более двух сотен видов животных – млекопитающих, членистоногих, простейших – и, соответственно, инфицированные ими объекты окружающей среды – вода, продукты, корма.

Две основных цели диагностики требуют различного подхода – в случае клинической диагностики необходимо обнаружение консервативных последовательностей генома туляремийного микроба, а в случае эпидемиологического расследования требуется установление родственных связей с геномом эпидемического штамма и выявление количества отличий в геномах.

При инфицировании туляремийным микробом люди обращаются в медицинские учреждения не сразу, а когда уже появляется лихорадка, повышенная температура, увеличиваются лимфоузлы, болит горло или имеются симптомы коньюнктивита, или кашель, или боль в животе, или все вместе. Заподозрить туляремию при спорадической (не групповой, не эпидемической) заболеваемости сложно. Начать правильное эффективное лечение еще сложнее, так как бактерия устойчива ко многим классам антибиотиков и поддается лечению в основном только тетрациклинами, аминогликозидами и фторхинолонами.

Методы исследования туляремийного микроба. В настоящее время для индикации, идентификации и исследования туляремийного микроба применяется огромное количество методов, их сочетаний и модификаций.

Бактериологический и биологический методы применяют для выделения культуры возбудителя. Из-за малой обсемененности возбудителем органов и биологических жидкостей при заболевании туляремией редко удается выделить культуру *F. tularensis* из крови, пунктата воспалившегося лимфатического узла, отделяемого кожной язвы, конъюнктивы глаза или носоглотки больного. Возбудитель туляремии быстро проникает и размножается в макрофагах, нейтрофилах, моноцитах, дендритных клетках, эндотелиальных и альвеолярных эпителиальных клетках типа II, гепатоцитах и даже эритроцитах [1]. Насколько рано и достоверно патоген можно обнаружить в крови при заражении бактерией *F. tularensis*, еще предстоит выяснить. Выделение возбудителя непосредственно от больного человека удается менее чем в 10% случаях заболевания туляремией [2]. Однако этот шанс никогда нельзя упускать, тем более что для большей части методов нужна чистая культура и выделенная из нее ДНК. Для обогащения культуры полученные образцы можно проводить через высокочувствительных лабораторных животных (мышей и морских свинок). Изолированные колонии на специальных питательных средах для культивирования и выделения туляремийного микроба образуются только через 2–3 суток инкубации посевов. Туляремийный микроб обладает множественной лекарственной устойчивостью. Значительная часть культур *F. tularensis* subsp. *holarctica*, выделяемых на территории Российской Федерации, представлена эритромицинустойчивыми штаммами. Микроб обладает β-лактамазной активностью, а β-лактамное кольцо содержат антибиотики из групп пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов и монобактамов. Для подавления роста посторонней микрофлоры в среду выращивания добавляют антибиотики, к которым возбудитель туляремии устойчив: пенициллин (100 ед./мл), ампициллин (100 ед./мл), полимиксин В (50–100 мкг/мл), кефзол (или цефалексин), амфотерицин В (или амфоглюкамин), ристомицина сульфат и некоторые другие антибактериальные препараты [3].

Выделить культуру из комаров, клещей и других насекомых, из погадок птиц и помета грызунов, а также из воды и других объектов окружающей среды высевом на любые питательные среды не удастся. Клетки возбудителя туляремии могут длительное время находиться в окружающей среде в неактивном состоянии практически без репликации и переходить в инфекционное, жизнеспособное, но не культивируемое состояние. Многие исследователи регулярно обнаруживали ДНК или клетки штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* в пробах воды и ила с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или путем заражения чувствительного лабораторного животного инфицированной водой, но не смогли культивировать на искусственных питательных средах эти пробы в отличие от штаммов *F. tularensis* subsp. *novicida* и *F. philomiragia* [4].

Большое количество методов индикации разработаны на принципе антиген–антитело [5]. К ним относятся – реакция агглютинации, тест микроагглютинации, реакция непрямой гемагглютинации, реакция торможения непрямой гемагглютинации, иммунофлуоресцентный метод, реакция нейтрализации антител, реакция нейтрализации антигена, реакция латекс-агглютинации [6], иммунохроматографические тесты, микроскопия окрашенных комплексов, конкурентный и непрямой иммуноферментный анализ [7–9], олигонуклеотид-связанный иммуносорбентный анализ с наночастицами золота (gold nanoparticle-based oligonucleotide-linked immunosorbent assay/GNP-OLISA) [10], иммунохроматографический анализ, использование для накопления антигена магноиммуносорбентов, иммуносенсорный анализ и др.

Чувствительность иммуно-серологических тестов в большинстве случаев не превышает 10^6 кл./мл.

Кроме того для индикации, идентификации туляремийного микроба используются физико-химические методы анализа: гель-электрофорез в пульсирующем поле (Pilse-Field Gel Electrophoresis/PFGE), рамановское сканирование, фотонные биосенсоры, саузерн-блоттинг в методах риботипирования, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) и полиморфизм длин амплифицированных фрагментов геномной ДНК (amplified fragment length polymorphism/AFLP), а также масс-спектрометрические методы MALDI/SELDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry / Surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry), которые выявляют уникальный набор белков исследуемых микроорганизмов – своеобразный «отпечаток пальца».

Доминирующим методом прямого обнаружения ДНК туляремийного микроба является ПЦР и ее многочисленные разновидности, которые не требуют живых клеток, чистой культуры и даже очищенной ДНК. При специфической ПЦР амплифицируются видо-, группо- или штаммоспецифичные фрагменты ДНК. Для постановки клинического диагноза «туляремия» на территории Евразии обычно достаточно определения рода, вида или подвида бактерии, как правило, это будет *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Для этого сравнивают

Таблица 1. **Сравнение методов индикации и идентификации туляремийного микроба**
*Table 1. **Comparison of methods for indication and identification of the tularemia microbe***

Метод исследования / *Research method*	Уровень выявления / *Detection level*	Комментарии / *Comments*
Культуральный / *Cultural*	Род / *Genus*	Долго, риск заражения, низкая чувствительность / *Long, risk of infection, low sensitivity [2]*
Агглютинация / *Agglutination*	Вид / *Species*	Просто, недорого, перекрестные реакции, низкая чувствительность / *Simple, inexpensive, cross-reactions, low sensitivity [5]*
Латекс-агглютинация / *Latex agglutination*	Вид / *Species*	Быстро (5 мин) / *Fast (5 min) [6]*
ELISA	Вид / *Species*	В 10 раз более чувствительна, чем агглютинация, задержка от начала инфекции / *10 times more sensitive than agglutination, delay from onset of infection[7–9]*
GNP-OLISA	Вид / *Species*	25 CFU/ml, в 37 раз более чувствительна, чем ELISA / *25 CFU/ml, 37 times more sensitive than ELISA [10]*
SELDI-TOF/MS	Подвид / *Subspecies*	Меньше потерь и проще приготовление образцов, чем при MALDY / *Less wastage and easier sample preparation than MALDY [11, 13]*
MALDY-TOF/MS	Вид/Подвид / *Species/Subspecies*	LOD 80 CFU, быстро (10–30 мин), меньше пиков, чем в SELDI / *LOD 80 CFU, fast (10–30 min), fewer peaks than SELDI [12, 13]*
Рамановское сканирование / *Raman scanning*	Вид/Подвид / *Species/Subspecies*	Быстро (15 мин), необходима спектральная библиотека изолированных штаммов / *Fast (15 min), requires a spectral library of isolated strains [14]*
Сенсор / *Sensor*	Вид / *Species*	Быстро (30 мин), специфичен, чувствительность (LOD 15 нг/мл) / *Fast (30 min), specific, sensitive (LOD 15 ng/ml) [15, 16]*
Риботипирование / *Ribotyping*	Вид/Подвид / *Species/Subspecies*	Необходимо выделение чистой культуры / *It is necessary to isolate a pure culture [17]*
рРНК / *rRNA*	Вид / *Species*	LOD 105 CFU/ml, включает экстракцию РНК / *LOD 105 CFU/ml, includes RNA extraction [18]*
AFLP	Подвид / *Subspecies*	Менее подвержены лабораторной инфекции, более трудоемкие, чем ПЦР / *Less susceptible to laboratory infection, more labor-intensive than PCR [19]*
RFLP	Вид / *Species*	Включает амплификацию генов, расщепленных ферментами / *Involves amplification of genes cleaved by enzymes [20]*
PEGE	Подвид / *Subspecies*	Требует выделения чистой культуры / *Requires isolation of pure culture [20]*
MLVA	Штамм / *Strain*	Требует выделения чистой культуры / *Requires isolation of pure culture [21]*
SNP	Подвид/штамм / *Subspecies/Strain*	Быстрое, недорогое типирование штамма, подходит для эволюционного анализа / *Rapid, inexpensive strain typing, suitable for evolutionary analysis [22, 23]*
PCR	Подвид/штамм / *Subspecies/Strain*	Быстро, не требует выделения чистой культуры / *Fast, does not require isolation of pure culture [24]*
Tagman	Подвид / *Subspecies*	Быстрый, точный, чувствительный (LOD 1 CFU/GE) / *Fast, accurate, sensitive (LOD 1 CFU/GE)*
RT-PCR	Подвид/штамм / *Subspecies/ Strain*	Быстрый, меньше ложноположительных результатов, чем в ПЦР, LOD 25 ГЭ / *Fast, fewer false positives than PCR, LOD 25 GE*
Microarray	Подвид / *Subspecies*	Быстрый, LOD 20 ГЭ или 100 нг/мл, подходит для большого количества патогенов / *Fast, LOD 20 GE or 100 ng/ml, suitable for a wide range of pathogens [25]*
FilmArray	Род / *Genus*	LOD 12,5 ГЭ, недостаточно данных / *LOD 12.5 GE, insufficient data [26]*
LAMP	Вид / *Species*	Специфичен, LOD 25 ГЭ или 50 фг/мл / *Specific, LOD 25 GE or 50 fg/ml, [27]*
MLST	Подвид/штамм / *Subspecies/Strain*	Высокое разрешение, превосходит MLVA, способен установить генотип штамма / *High resolution, superior to MLVA, capable of determining the genotype of a strain [28]*
WGS	Геном / *Genome*	Высокое разрешение, ограниченное число секвенированных штаммов, дорого / *High resolution, limited number of sequenced strains, expensive [29, 30]*

консервативные последовательности генома рода, вида, подвида. Повышает чувствительность методов обнаружения инфекции выбор мультикопийных генов. В ПЦР с использованием случайных праймеров (randomly amplified polymorphic DNA/RAPD) происходит амплификация специфичных для каждого штамма или группы штаммов набора фрагментов ДНК, ограниченных этими случайными праймерами. В табл. 1 приведена сравнительная оценка методов исследования *F. tularensis*.

Особенности метода ПЦР при исследовании туляремийного микроба

Для индикации и идентификации штаммов также используются ПЦР, в которых происходит амплификация повторяющихся экстрагенных палиндромных последовательностей (repetitive extragenic palindromic sequences/REP-PCR), ДНК регионов отличия (region of difference/RD), последовательностей прямых повторов (Direct Repeated sequences/DFR), вариабельных нуклеотидных тандемных повторов (variable-number tandem repeat/VNTR). Разработаны RT-PCR – ПЦР в реальном времени, ПЦР в реальном времени в многолокусном варианте, NPCR – вложенная ПЦР (nested PCR), PCR-RFLP – амплификация коротких тандемных повторяющихся последовательностей (SSTR) для идентификации их генотипов (PCR-restriction fragment length polymorphism), Microarray – ПЦР в реальном времени в многолокусном варианте, FilmArray – NPCR-накопление ДНК (неспецифическое накопление, первые праймеры), вторая ПЦР-специфическая ДНК, автоматизированный анализ 96 лунок с разными праймерами, специфичными к разным инфекциям. Мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (Multilocus VNTR-Analysis/MLVA) обладает высокой разрешающей способностью и способен различать особенности генотипа штаммов внутри вида.

Метод CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) определяет в геноме кластеризованные короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами.

Разработан вариант ПЦР, которая осуществляется при постоянной температуре, т.н. петлевая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification/LAMP), которая не требует наличия дорогостоящего амплификатора [27].

Эволюционно стабильные точечные мутации внутри вида определяются методом анализа полиморфизма единичных нуклеотидов (canonical Single Nucleotide Polymorphism/SNP). CanINDEL выявляет эволюционно стабильные (канонические) вставки или делеции в геномах штаммов внутри вида (canonical insertion-deletions INDELs).

MLST – мультилокусное сиквенс-типирование – основано на установлении нуклеотидной последовательности небольших фрагментов (~500 п.н.) ряда генов и последующем сравнении соответствующих последовательностей у разных организмов. При мультилокусном секвенировании чаще всего анализируют так называемые гены «домашнего хозяйства», которые являются необходимыми для протекания реакций основного метаболизма, а значит, присутствуют у всех организмов.

Полногеномное секвенирование штамма (whole genome sequencing/WGS) показывает последовательность нуклеотидов в геноме конкретного штамма, решает множество задач, но требует больших материальных затрат, умения работать с большими массивами данных и требует знания биоинформационных программ.

Геномная таксономия и разнообразие семейства *Francisellaceae*

Наиболее полное на сегодняшний день описание геномной таксономии и разнообразия семейства *Francisellaceae* включает 9 родов, в т.ч. 4 входящих в группу «близкородственных»: *Francisella*, *Allofrancisella*, *Pseudofrancisella* и *Parafrancisella* [31]. Состав этого семейства был значительно расширен именно в последние 20 лет: были описаны и включены в него, кроме патогенных для человека и животных *F. tularensis*, условно-патогенные микроорганизмы, способные вызывать заболевания у людей с ослабленным иммунитетом (*F. novicida*, *F. hispaniensis*, *F. opportunistica* и *F. hilomiragia*), несколько видов франциселл, являющихся этиологическими агентами франсиселлеза, поражающего соответственно холодноводных и тепловодных рыб, а также моллюсков (*F. noatunensis*, *F. orientalis*, *F. marina* и *F. halioticida*), эндосимбионты клещей и инфузорий, сходные с *Francisella* (например, *F. persica*, *F. endociliophora* и *F. adeliensis*), и «экологические» таксоны, выделенные из морской воды, природных горячих источников, воды систем кондиционирования, льдогенераторов, с воздушных фильтров (*F. salina*, *F. salimarina*, *F. uliginis*, *F. frigiditurris*, *Allofrancisella* spp. и *Pseudofrancisella aestuarii*). Еще в 2005 г. описание семейства *Francisellaceae* в определителе микроорганизмов включало единственный род *Francisella*, 2 вида – *tularensis* и *philomiragia* – и 3 вида эндосимбионтов клещей.

Был проанализирован набор данных, включающий полные геномы 327 штаммов *F. tularensis* и 172 штаммов семейства *Francisellaceae*, не относящихся к виду *F. tularensis*. В проанализированном наборе данных (499 геномов) было выявлено только 6 коротких последовательностей, по-видимому, уникальных для вида *F. tularensis* (табл. 2).

Объяснение малого числа участков, уникальных для вирулентной *F. tularensis*, заключается в том, что были использованы строгие критерии для определения уникальности участка, что, возможно, ограничило полноту выявления уникальных генетических маркеров, а также в том, что эволюция этого вида характеризуется эрозией генома и, таким образом, немногие сохранившиеся уникальные участки представляют собой эволюционные реликты, что позволяет предположить их важную роль в жизненном цикле *F. tularensis*. Два из этих участков являются межгенными, а три представляют собой фрагменты псевдогенов или последовательностей, кодирующих гипотетические белки. Шестой участок соответствует части домена гена аденозиндезаминазы (FTT_0939) – фермента, играющего ключевую роль в метаболизме пуринов; однако предполагается, что этот ген функционально активен только у *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

Участок 1 (табл. 2) служит мишенью для нового ПЦР-теста (Ft-sp.FTS_0772), разработанного в ходе данного исследования и обладающего высокой специфичностью в отношении вида *F. tularensis* (табл. 3). Этот уникальный участок последовательности локализован в терминальном фрагменте гена *hsdS*, который исходно кодировал фермент

Таблица 2. **Информация о шести геномных участках, уникальных для вида *F. tularensis*, полученная на основе анализа *in silico* [31]**
*Table 2. **Information on six genomic regions unique to the species F. tularensis, obtained from in silico analysis [31]***

Region	LVS * Coordinates	SCHU S4 ** Coordinates	Marker Length	Annotation	Notes
1	1490829–1491161	1187496–1187828	333	hsdS, type I restriction modification domain protein	partial locus
2	84841–85406	378437–377872	567	FTT_0376c, hypothetical membrane protein	partial locus
3	1673808–1673858	547774–547824	51	FTT_0525, conserved hypothetical protein	
4	43283–43397	951193–951307	114	add1, adenosine deaminase	partial locus
5	43766–43874	950716–950824	109	intergenic, region between bioA and add1	
6	135869–136156	765604–765891	288	FTT_0742, hypothetical protein	partial locus

* CP009694.1, ** GCA_000008985.1.

Region	LVS * Coordinates	SCHU S4 ** Coordinates	Marker Length	Annotation	Notes
1	1490829–1491161	1187496–1187828	333	hsdS, type I restriction modification domain protein	partial locus
2	84841–85406	378437–377872	567	FTT_0376c, hypothetical membrane protein	partial locus
3	1673808–1673858	547774–547824	51	FTT_0525, conserved hypothetical protein	
4	43283–43397	951193–951307	114	add1, adenosine deaminase	partial locus
5	43766–43874	950716–950824	109	intergenic, region between bioA and add1	
6	135869–136156	765604–765891	288	FTT_0742, hypothetical protein	partial locus

* CP009694.1, ** GCA_000008985.1.

Таблица 3. **Праймеры и зонды TaqMan-MGB для выявления в режиме реального времени вида *F. tularensis* [31]**
*Table 3. **TaqMan-MGB primers and probes for real-time detection of F. tularensis***

Assay	Region in Genome of SCHU S4 [a]	Sequences of Forward and Reverse Primers [b] and Probes [c]	Primer (μM) [d]	MGB [e]	Probe (μM) [f]	Tm °C [g]
Ft-sp. FTT0376	377718–377824	F CCATATCACTGGCTTTGCTAGACTAGT R TGTTGGCAAAAGCTAAAGAGTCTAAA FAM-AAATTATAAAACCAAACCCAGACCTTCAAACCACA	0.9	no	0.2	60
Ft-sp.3Pan	8967–9049	F TTTACACCCGTCTCCGTTAGT R CTCTTAAGGATGCAATTTGGGATT FAM-AAGAGGCAAAGCTGGAATTACACTCTCTC	0.9	no	0.2	60
Ft-sp. FTS_0772	1187646–1187807	F CAAGGTAAAGAAATTAAGAGTAGTAAAGTTGAATTC R ATTTAATCTAGTATTATCAATTGGGTAAAAAGGTA FAM-GATGTGGCAACAACTGAAAT	0.9	yes	0.2	63

[a] Position coordinates of assay target within reference SchuS4 whole genome sequence (AJ749949.2); [b] F: forward primer, R: reverse primer; [c] 6-carboxyfluorescein (FAM) fluorophore and a 3= black hole quencher-1 (BHQ-1) quencher; [d] Primer concentration (μM) per reaction; [e] Minor Groove Binding moiety on probe; [f] Probe concentration (μM) per reaction; [g] Real-time PCR annealing temperature.

Assay	Region in Genome of SCHU S4 [a]	Sequences of Forward and Reverse Primers [b] and Probes [c]	Primer (μM) [d]	MGB [e]	Probe (μM) [f]	Tm °C [g]
Ft-sp. FTT0376	377718–377824	F CCATATCACTGGCTTTGCTAGACTAGT R TGTTGGCAAAAGCTAAAGAGTCTAAA FAM-AAATTATAAAACCAAACCCAGACCTTCAAACCACA	0.9	no	0.2	60
Ft-sp.3Pan	8967–9049	F TTTACACCCGTCTCCGTTAGT R CTCTTAAGGATGCAATTTGGGATT FAM-AAGAGGCAAAGCTGGAATTACACTCTCTC	0.9	no	0.2	60
Ft-sp. FTS_0772	1187646–1187807	F CAAGGTAAAGAAATTAAGAGTAGTAAAGTTGAATTC R ATTTAATCTAGTATTATCAATTGGGTAAAAAGGTA FAM-GATGTGGCAACAACTGAAAT	0.9	yes	0.2	63

[a] Position coordinates of assay target within reference SchuS4 whole genome sequence (AJ749949.2); [b] F: forward primer, R: reverse primer; [c] 6-carboxyfluorescein (FAM) fluorophore and a 3= black hole quencher-1 (BHQ-1) quencher; [d] Primer concentration (μM) per reaction; [e] Minor Groove Binding moiety on probe; [f] Probe concentration (μM) per reaction; [g] Real-time PCR annealing temperature.

рестрикции I типа; это согласуется с процессом эрозии генома, приведшим к существенной утрате способности к рестрикции у вирулентных штаммов *F. tularensis*. В ходе *in silico* анализа лишь две тест-системы – Ft-sp3Pan и Ft-sp. FTT0376 – продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность в отношении вида *F. tularensis* (табл. 3). Однако ограничением данной проверки стало отсутствие в панели штамма TX07-6608. Этот таксон, по крайней мере теоретически, мог бы снизить специфичность системы Ft-sp. FTT0376. Еще одним результатом стало то, что система Ft-sp3Pan не позволила исключить все близкородственные виды из нашей панели: наблюдалась выраженная амплификация для двух штаммов *F. philomiragia* (F1091 и F1093).

Данное исследование существенно расширяет представление о геномном разнообразии семейства *Francisellaceae*. Ранее методы диагностики *F. tularensis* сталкивались с про-

блемой наличия обширного, но недостаточно изученного пангенома *Francisellaceae*, что приводило к ложноположительным результатам, создающим трудности при рутинном мониторинге биологических угроз.

При решении вопроса происхождения источника эпидемии недостаточно определения рода и вида бактерии. Необходимо определить подвид, основную филогенетическую группу, SNP-группу, генотип, близкородственные геномы. Генетическая вариабельность подвидов, субпопуляций и отдельных штаммов микроорганизмов связана с утратой или приобретением новых генов, наличием крупных хромосомных перестроек (перемещений или инверсий), существованием мелких вставок или делеций, а также различий в структуре элементов вставок (IS element), наличием в геноме полиморфизма единичных нуклеотидных замен (SNP), изменения числа копий повторяющихся последовательностей ДНК и т.д. Для сравнения генотипов штаммов, циркулирующих в районе эпидемии, необходим сиквенс всего генома или его наиболее информационной, изменяющейся (не консервативной) последовательности (MLVA (M-3), MLST, SNP, INDEL….), чтобы отличить генотипы, распространенные в окружающих природных очагах, от постороннего, занесенного источника инфекции. Эти вопросы могут решать молекулярно-генетические методы анализа и филогенетические исследования, для которых нужны чистые культуры и выделенные из них ДНК.

Современная таксономия и инфекционная диагностика основана на методах сравнения последовательностей ДНК.

Однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism/SNP, снип) возникает в результате точечных мутаций. Это отличие последовательности ДНК размером в один нуклеотид (A, T, G или C) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом. Если две последовательности ДНК – AAGCCTA и AAGCTTA – отличаются на один нуклеотид, в таком случае говорят о существовании двух аллелей: C и T. Изменения в сравниваемых геномах:

1) характеризуемые по длине сиквенса:

a) точечная мутация (только один нуклеотид);

b) длинная мутация (затрагивает 2 или более соседних нуклеотидов);

2) характеризуемые по способу замены нуклеотидов:

a) Substitution (замена одного нуклеотида на другой).

b) Inversion (переворот 2 или нескольких нуклеотидов одной части ДНК на 180°).

c) Insertion (вставка одного или нескольких нуклеотидов).

d) Deletion (потеря одного или нескольких нуклеотидов, InDels).

Для дискриминации близких генотипов внутри штаммов одного подвида туляремийного микроба применяется метод MLVA. Для проведения эпидемиологического расследования иногда достаточно одного VNTR (variable-number tandem repeat) маркера – гипервариабельного локуса FtM-3, количество повторов которого – это единственное отличие выделенных штаммов при расследовании эпидемической вспышки.

Использование метода MLVA позволяет с высокой точностью генотипировать изолят, так как секвенирование генома штамма остается пока еще дорогостоящей процедурой.

Поиск известной последовательности нуклеиновой кислоты в образце – самая частая и непростая задача в молекулярной биологии – имеет множество решений. Классический ПЦР-скрининг с гель-электрофорезом отлично справляется с простыми качественными анализами. Количественная ПЦР в реальном времени решает более сложные задачи, для поиска отдельных молекул в сложных образцах существуют разнообразные варианты анализа на ДНК-чипах и различные капельные цифровые ПЦР [32, 33]. Многие из этих методов обладают феноменальной точностью и позволяют найти буквально единичные молекулы нуклеиновых кислот. К сожалению, все они требуют дорогих и громоздких приборов, а также долгого времени на анализ.

В 2017 г. был описан метод, который из-за своей выдающейся способности быстро находить отдельные молекулы нуклеиновых кислот получил броское название SHERLOCK (Specific High sensitivity Enzymatic Reporter unlocking) [34].

Аналогично большинству аналитических методов, SHERLOCK начинается со стадии амплификации. Но в нем используется не обычная трехстадийная ПЦР, требующая высокотемпературного плавления ДНК, отжига праймеров и элонгации при температуре 72°C, а ее близкий, но гораздо менее капризный родственник – рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) [35]. В этой реакции, протекающей в изотермических условиях с оптимумом в 37–42°C, в обязательном порядке используют набор из трех белков (рекомбиназы, SSB-белка и вытесняющей ДНК-полимеразы) и пары праймеров к амплифицируемому фрагменту. Фермент рекомбиназа провоцирует спаривание олигонуклеотидного праймера с комплементарной последовательностью в двухцепочечной ДНК-матрице уже при комнатной температуре. Чтобы праймер не был вытеснен вернувшейся на свое место второй цепью матрицы, в смеси всегда находится избыток SSB-белков, стабилизирующих одноцепочечную ДНК. С двух праймеров, севших на матрицу с помощью упомянутых белков-помощников, начинается синтез ДНК, который ведет Bst-полимераза, вытесняющая по ходу движения вторую цепь из ДНК-дуплекса, ее оптимум – 65°C, но и при температуре 37°C она все еще сохраняет свою активность.

Если мы имеем дело с РНК-матрицей, то описанную смесь реагентов дополняет обратная транскриптаза, превращающая реакцию в RT-RPA. После раунда амплификации смесь олигонуклеотидов подвергается транскрипции с помощью T7 РНК-полимеразы, промотор которой содержится в праймерах, использованных в RPA. Так после двух или трех (в случае RT-RPA) реакций синтеза мы получаем смесь нуклеиновых кислот, обогащенную молекулами РНК искомой последовательности. Затем в дело вступает система CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – кластеризованные короткие палиндромные повторы с регулярными интервалами) [33]. Системы CRISPR-Cas используются бактериями для защиты от вирусов и состоят из двух основных блоков: CRISPR-кассеты и прилегающего к ней кластера генов cas. Кассета – это блок прямых, почти палиндромных («зеркальных», взаимокомплементарных последовательностей, способных складываться в шпильки) повторов размером 24–48 п.н. Эти повторы перемежаются спейсерами – уникальными вставками примерно такой же длины. Спейсеры идентичны различным участкам фагов и

других мобильных элементов, когда-либо проникавших в эту клетку или ее предков. Число повторов в разных системах варьирует от единиц до сотен.

Гены *cas* кодируют белки, берущие на себя всю тяжесть работы по встраиванию спейсеров и уничтожению агентов с идентичными последовательностями (протоспейсерами) и помогающие процессировать CRISPR-транскрипт: разделять фото-гирлянду на отдельные портреты. Функцию уничтожения выполняют Cas-белки, называемые эффекторными. В зависимости от типа эффекторов все CRISPR-системы разделяют на два класса: у I класса мишень уничтожается мультибелковым комплексом, у II класса – одним крупным белком. Далее эти классы подразделяются на 6 типов. Большинство эффекторов атакует ДНК, лишь один – исключительно РНК, редкие – обе молекулы. Один организм может содержать несколько разных систем, а спейсеры различаются в разных клетках даже одной популяции.

Системы разных классов эволюционно не родственны друг другу, а системы разных типов одного класса значительно отличаются по механизмам защитного действия. Системы на основе белка-эффектора Cas9 – это класс 2, тип II. В последнее время вырос интерес к системам класса 2, типа VI, которые, в отличие от других систем, в качестве мишени используют РНК.

С исследовательской точки зрения крайне интересна система класса 1 типа III. Она имеет удивительное свойство – ее эффектор, РНК-запрограммированная Cas-нуклеаза, узнает транскрипт РНК в то время, когда он синтезируется РНК-полимеразой по ДНК, т.е. котранскрипционно. После того, как происходит узнавание, включается специальная активность: эффектор начинает разрушать вокруг себя и ДНК, и РНК.

Открыт совершенно новый пласт клеточной регуляции за счет малых олигонуклеотидов, которые синтезируются в клетке в ответ на узнавание эффектором РНК. Эти олигонуклеотиды понижают способность активированного эффектора неспецифически расщеплять нуклеиновые кислоты.

В 2022 г. в работе Xu et al. [36] RPA объединили с системой CRISPR/Cas12a для выбора целевого гена *F. tularensis* (TUL4), создав двухкомпонентный быстрый и сверхчувствительный диагностический метод для обнаружения *F. tularensis*. Анализ RPA в реальном времени (RT-RPA) выявил *F. tularensis* в течение 10 мин при чувствительности 5 копий/реакцию, геномную ДНК *F. tularensis* 5 фг и *F. tularensis* $2{\cdot}10^2$ КОЕ/мл; анализ RPA-CRISPR/Cas12a обнаруживает *F. tularensis* в течение 40 мин при чувствительности 0,5 копий/реакцию, геномную ДНК *F. tularensis* 1 фг и *F. tularensis* 2 КОЕ/мл. Кроме того, оценка специфичности показала, что оба анализа высокоспецифичны к *F. tularensis*. Что еще более важно, при тестировании подготовленных образцов искусственной крови и сточных вод результаты анализа ОТ-RPA (обратная транскрипция-RPA) согласовывались с результатами анализа ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-ПЦР), а анализ RPA-CRISPR/Cas12a позволил обнаружить незначительное количество геномной ДНК *F. tularensis* (2,5 фг). Неспецифического обнаружения в образцах крови и сточных вод не наблюдалось, что обусловило высокую практическую ценность тестов. Например, в очагах заболеваний и эпидемических зонах ОТ-RPA использовался для быстрого скрининга, а анализ RPA-CRISPR/Cas12a – для более точной диагностики.

Предел обнаружения (LOD95%) для ПЦР в реальном времени при обнаружении *Francisella* spp. составил 0,297 фг (0,145 геномных эквивалентов (ГЭ)) для ДНК subsp. *holarctica* и 0,733 фг (0,358 ГЭ) для ДНК subsp. *mediasiatica*. LOD95% для дифференциальной идентификации подвидов mediasiatica составил 8,156 фг (3,979 ГЭ) [37]. Достаточно ли этой чувствительности для обнаружения туляремийного микроба в крови заболевшего и через какое количество времени после заражения его можно выявить, еще предстоит уточнить.

Технология CRISPR позволяет изучать роль конкретных генов в процессах развития и жизнедеятельности организмов. Как вариант – устанавливать роль генов и их перестроек в возникновении и прогрессировании генетических болезней и рака: этот инструмент позволяет создавать прекрасные модельные системы для улучшения свойств сельскохозяйственных животных и растений; контроля распространения инфекций, переносимых животными; конструирования новых метаболических путей и осуществления направленной эволюции биомолекул; терапии наследственных заболеваний. CRISPR-Cas9 в культурах клеток или животных моделях уже «примерили» для серповидноклеточной анемии и β-талассемии, M2DS-синдрома и миодистрофии Дюшенна, муковисцидоза (исправили мутантный CFTR-локус в кишечных стволовых клетках человека) и тирозинемии, катаракты (у мышей устранили доминантную мутацию в гене *Crygc*) и пигментного ретинита.

В основе парадигмы аптамеров как возможных лигандов, связывающих биомолекулы, лежат представления о взаимодействии нуклеиновых кислот с белками, низкомолекулярными лигандами (рибо-свитчи, или рибопереключатели), а также о каталитической активности РНК и ДНК [38, 39]. Термин «аптамер» происходит от лат. «aptus», что значит «соответствие», и греч. «μέρος» – «область». Аптамеры к *F. tularensis* – это короткие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, которые избирательно связываются с антигенами возбудителя туляремии. Предложена сравнительно новая технология SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения для получения аптамеров с заданными свойствами). В качестве стартового вещества в этом методе используется библиотека олигонуклеотидов, в которой каждый олигонуклеотид имеет общие 3’ и 5’ фланги длиной 17–25 нуклеотидов, а средние области длиной 20–60 нуклеотидов уникальны. Такую библиотеку можно синтезировать как единый препарат олигонуклеотида, в котором в средней части в каждой позиции с равной вероятностью включается каждый из четырех нуклеотидов. Данный препарат инкубируют с молекулой-мишенью, которая обычно зафиксирована на каком-либо твердом носителе. Олигонуклеотиды, не связавшиеся с мишенью, удаляют, а связавшиеся амплифицируют при помощи ПЦР, используя общие 3’ и 5’ фланги. Данный цикл повторяют несколько раз, в результате чего происходит обогащение последовательностями, имеющими сродство к молекуле-мишени. Аптамеры можно рассматривать как аналоги моноклональных антител. При этом они имеют ряд важных преимуществ перед анти-

телами. Их получение значительно проще, дешевле и быстрее, они имеют значительно меньший размер, и потому легче проникают в ткани и клетки, могут иметь более высокую аффинность и специфичность.

Аптамеры могут быть использованы в следующих исследовательских, диагностических и терапевтических задачах: 1) для детекции различных молекул-мишеней как в научных, так и в диагностических задачах, они могут заменить антитела в вестерн-блоттинге, флуоресцентной гибридизации *in situ* и в методе ELISA; 2) перспективным для диагностики форматом является создание чипов со множеством аптамеров и возможностью одновременной детекции многих белков; 3) для аффинной очистки молекул-мишеней; 4) для эффективного и специфичного ингибирования белков-мишеней, такое ингибирование может быть использовано как в исследовательских целях, так и для создания новых лекарств, некоторые такие лекарства уже находятся на стадии клинических испытаний; 5) перспективным направлением использования аптамеров является направленный транспорт лекарств, аптамеры в этом случае определяют адресность доставки (targeting ligands).

Был выделен набор из 25 уникальных последовательностей ДНК, которые специфически связываются с *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. japonica. При тестировании в «сэндвич»-анализе с использованием иммобилизованных сорбентов, связанных с аптамерами (ALISA), и дот-блот-анализе коктейль аптамеров продемонстрировал специфичность в своей способности связываться только с бактериальным антигеном туляремии подвидов *holarctica* (в т.ч. биовара japonica) и *tularensis*. Таким образом, представляется, что этот новый коктейль аптамеров против туляремии может найти применение в качестве реагента для обнаружения потенциального агента биологического оружия, такого как *F. tularensis* [40].

Заключение

Таким образом, развитие методов диагностики туляремии позволило значительно расширить семейство *Francisellaceae* десятками новых видов, способных обитать в самых разнообразных экологических нишах, систематизировать обнаруженные геномы в новые роды и виды, найти последовательности, уникальные для генома вида *F. tularensis*, патогенного для человека, предложить тест-системы для его специфической идентификации, повысить чувствительность индикации патогена до фемтограммовых количеств (фг), что соответствует десятым долям ГЭ ДНК возбудителя туляремии.

При выборе методов индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний необходимо учитывать, что для микроорганизмов характерно клональное размножение, но их геномы постоянно эволюционируют с помощью широкого спектра механизмов, которые приводят к образованию новых генов, горизонтальному переносу генов и утрате генов. Данные механизмы включают: точечные мутации, внутригеномные перестройки, делеции, вставки, дупликации, лизогению, деградацию генов, приобретение и элиминацию плазмид и фагов, транспозиции, снижение числа копий в повторяющихся последовательностях ДНК, а также гомологичную и негомологичную рекомбинацию. В связи с этим регулярно обнаруживаются штаммы внутри вида и подвида, которые или не содержат детектируемой последовательности, или данный хромосомный или плазмидный маркер выявляется у других бактерий и животных. Поэтому постоянно продолжается поиск высокоспецифичных последовательностей и анализ универсальности выбранных праймеров и зондов для характеристики конкретного вида, подвида, биовара, филогенетической группы этого возбудителя особо опасной инфекции. И необходимо использование нескольких методов для подтверждения результата исследований.

Также необходимо решить задачу – как рано и можно ли с помощью ПЦР при исследовании образцов крови выявить заболевших туляремией, так как при этом заболевании наблюдается малая обсемененность возбудителем органов и биологических жидкостей.

Основные проблемы при разработке методов анализа, специфичных для *F. tularensis*, связаны, во-первых, с риском получения ложноотрицательных результатов, хотя этот вид достаточно хорошо изучен и характеризуется высокой мономорфностью, а во-вторых, с неизвестным разнообразием, предположительно существующим среди некультивируемых видов бактерий и, в частности, среди представителей окружающей среды, еще не изученных должным образом; примером тому служат недавно описанные штаммы *F. opportunistica* и штаммы, подобные *F. hispaniensis*.

Источники финансирования

Работа выполнена в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Funding

The work was carried out at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology using The Unique Research Facility SRCAMB within the framework of an industry research program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Bradford MK, Elkins KL. Immune lymphocytes halt replication of *Francisella tularensis* LVS within the cytoplasm of infected macrophages. Sci Rep. 2020 Jul 21;10(1):12023. DOI: 10.1038/s41598-020-68798-2
2. Nirkhiwale SD, Gehlot GS, Bandi AK, Jasani AN. Isolation of *Francisella tularensis* from blood culture. Indian J Med Microbiol. 2015 Apr-Jun;33(2):329-31. DOI: 10.4103/0255-0857.154901
3. Petersen JM, Carlson J, Yockey B, Pillai S, Kuske C, Garbalena G, et al. Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. Lett Appl Microbiol. 2009 Jun;48(6):663-7. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02589.x
4. Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandström G. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. FEMS Microbiol Ecol. 2000 Mar 1;31(3):217-224. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00686.x
5. Kiliç S, Celebi B, Yeşilyurt M. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for the serologic diagnosis of tularemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Sep;74(1):1-5. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.030
6. Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N, Chróst A, Gierczyński R. Development and evaluation of a latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of tularemia. J Microbiol Methods. 2015 May;112:1-2. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.02.012
7. Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Uda A, Fujita O, Mizoguchi T, et al. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014 Apr;14(4):234-9. DOI: 10.1089/vbz.2013.1349
8. Chaignat V, Djordjevic-Spasic M, Ruettger A, Otto P, Klimpel D, Müller W, Sachse K, Araj G, Diller R, Tomaso H. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. BMC Infect Dis. 2014 May 5;14:234. DOI: 10.1186/1471-2334-14-234
9. Rastawicki W, Wolaniuk N. Comparison of usefulness of commercial ELISA Virion/Serion, homemade ELISA and tube agglutination test in serodiagnosis of tularemia. Med Dosw Mikrobiol. 2013;65(4):255-61. (In Polish).
10. Seo SH, Lee YR, Ho Jeon J, Hwang YR, Park PG, Ahn DR, et al. Highly sensitive detection of a bio-threat pathogen by gold nanoparticle-based oligonucleotide-linked immunosorbent assay. Biosens Bioelectron. 2015 Feb 15;64:69-73. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.038
11. Lundquist M, Caspersen MB, Wikström P, Forsman M. Discrimination of *Francisella tularensis* subspecies using surface enhanced laser desorption ionization mass spectrometry and multivariate data analysis. FEMS Microbiol Lett. 2005 Feb 1;243(1):303-10. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.12.020
12. Durighello E, Bellanger L, Ezan E, Armengaud J. Proteogenomic biomarkers for identification of *Francisella* species and subspecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem. 2014 Oct 7;86(19):9394-8. DOI: 10.1021/ac501840g
13. Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. J Clin Microbiol. 2010 Apr;48(4):1061-9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09
14. Fey PD, Dempsey MM, Olson ME, Chrustowski MS, Engle JL, Jay JJ, et al. Molecular analysis of *Francisella* tularensis subspecies tularensis and holarctica. Am J Clin Pathol. 2007 Dec;128(6):926-35. DOI: 10.1309/JN3NTHK4VVWKJT4A
15. Dulay SB, Julich S, Tomaso H, O'Sullivan CK. Development of an immunosensor for the detection of *Francisella tularensis* antibodies. Anal Bioanal Chem. 2014 Jul;406(19):4685-90. DOI: 10.1007/s00216-014-7860-2
16. Cooper KL, Bandara AB, Wang Y, Wang A, Inzana TJ. Photonic biosensor assays to detect and distinguish subspecies of *Francisella tularensis*. Sensors (Basel). 2011;11(3):3004-19. DOI: 10.3390/s110303004
17. Grif K, Dierich MP, Much P, Hofer E, Allerberger F. Identifying and subtyping species of dangerous pathogens by automated ribotyping. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003 Sep;47(1):313-20. DOI: 10.1016/s0732-8893(03)00095-6
18. Johansson A, Forsman M, Sjöstedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. APMIS. 2004 Nov-Dec;112(11-12):898-907. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1212.x
19. García Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, De La Puente VA, Gutiérrez CB, Hadfield TL, et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 2002 Aug;40(8):2964-72. DOI: 10.1128/JCM.40.8.2964-2972.2002
20. Smith-Vaughan HC, Sriprakash KS, Mathews JD, Kemp DJ. Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1646-7. DOI: 10.1128/jcm.35.6.1646-1647.1997
21. Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J Bacteriol. 2004 Sep;186(17):5808-18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004
22. Pandya GA, Holmes MH, Petersen JM, Pradhan S, Karamycheva SA, Wolcott MJ, et al. Whole genome single nucleotide polymorphism based phylogeny of *Francisella tularensis* and its application to the development of a strain typing assay. BMC Microbiol. 2009 Oct 7;9:213. DOI: 10.1186/1471-2180-9-213
23. Lärkeryd A, Myrtennäs K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, et al. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. Bioinformatics. 2014 Jun 15;30(12):1762-4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113
24. Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5492-9. DOI: 10.1128/JCM.41.12.5492-5499.2003
25. Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, Byström M, Eriksson U, Larsson E, et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent F. tularensis subsp. tularensis. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):2924-31. DOI: 10.1128/JCM.41.7.2924-2931.2003
26. Seiner DR, Colburn HA, Baird C, Bartholomew RA, Straub T, Victry K, Hutchison JR, Valentine N, Bruckner-Lea CJ. Evaluation of the FilmArray® system for detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. J Appl Microbiol. 2013 Apr;114(4):992-1000. DOI: 10.1111/jam.12107
27. Caipang CM, Kulkarni A, Brinchmann MF, Korsnes K, Kiron V. Detection of *Francisella piscicida* in Atlantic cod (Gadus morhua L) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. Vet J. 2010 Jun;184(3):357-61. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.03.027
28. Antwerpen MH, Prior K, Mellmann A, Höppner S, Splettstoesser WD, Harmsen D. Rapid high resolution genotyping of *Francisella tularensis* by whole genome

sequence comparison of annotated genes ("MLST+"). PLoS One. 2015 Apr 9;10(4):e0123298. DOI: 10.1371/journal.pone.0123298
29. Davenport KW, Daligault HE, Minogue TD, Bishop-Lilly KA, Broomall SM, Bruce DC, et al. Whole-genome sequences of nine *Francisella* isolates. Genome Announc. 2014 Sep 25;2(5):e00941-14. DOI: 10.1128/genomeA.00941-14
30. Johnson SL, Daligault HE, Davenport KW, Coyne SR, Frey KG, Koroleva GI, et al. Genome sequencing of 18 *Francisella* strains to aid in assay development and testing. Genome Announc. 2015 Apr 30;3(2):e00147-15. DOI: 10.1128/genomeA.00147-15
31. Öhrman C, Sahl JW, Sjödin A, Uneklint I, Ballard R, Karlsson L, et al. Reorganized Genomic Taxonomy of *Francisellaceae* Enables Design of Robust Environmental PCR Assays for Detection of *Francisella tularensis*. Microorganisms. 2021 Jan 11;9(1):146. DOI: 10.3390/microorganisms9010146
32. Severgnini M, Cremonesi P, Consolandi C, De Bellis G, Castiglioni B. Advances in DNA Microarray Technology for the Detection of Foodborne Pathogens. Food Bioprocess Technol. 2010;4:936-953. DOI: 10.1007/s11947-010-0430-5
33. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol. 2006 Jul;4(7):e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
34. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321
35. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. DOI: 10.1126/science.1231143
36. Xu J-H, Kang L, Yuan B, Feng Z-H, Li S-Q, Wang J, et al. Development and evaluation of a rapid RPA/CRISPR-based detection of *Francisella tularensis*. Front. Microbiol. 2022;13:901520. DOI: 10.3389/fmicb.2022.901520
37. Shevtsov A, Dauletov A, Izbanova U, Kairzhanova A, Tursunbay N, Kiyan V, et al. Development of a Real-Time PCR Assay for the Detection of *Francisella* spp. and the Identification of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Microorganisms. 2024;12(11):2345. DOI: 10.3390/microorganisms12112345
38. Зенинская НА, Колесников АВ, Рябко АК, Шемякин ИГ, Дятлов ИА, Козырь АВ. Аптамеры для терапии бактериальных инфекций: проблемы и перспективы. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016;71(5):350-8. / Zeninskaya NA, Kolesnikov AV, Ryabko AK, Shemyakin IG, Dyatlov IA, Kozyr AV. Aptamers in the Treatment of Bacterial Infections: Problems and Prospects. Vestn Ross akad med nauk. 2016;71(5):350-8. DOI: 10.15690/vramn591 (In Russian).
39. Lamont EA, Wang P, Enomoto S, Borewicz K, Abdallah A, Isaacson RE, Sreevatsan S. A combined enrichment and aptamer pulldown assay for *Francisella tularensis* detection in food and environmental matrices. PLoS One. 2014 Dec 23;9(12):e114622. DOI: 10.1371/journal.pone.0114622
40. Vivekananda J, Kiel JL. Anti-*Francisella tularensis* DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. Lab Invest. 2006 Jun;86(6):610-8. DOI: 10.1038/labinvest.3700417

Информация о соавторах:

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-3675-8780

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID:0000-0001-9478-5563

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Information about co-authors:

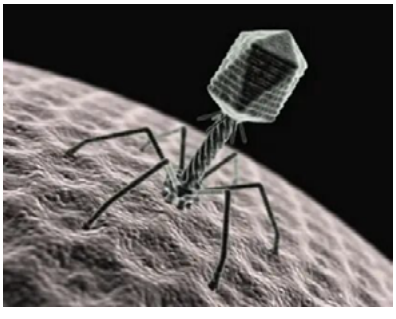
Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-3675-8780

Galina M. Titareva, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID:0000-0001-9478-5563

Alexey A. Gorbatov, PhD, MD, Deputy Director for scientific work, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Искусственные фаги против бактерий

Использование генеративных языковых моделей ИИ (Evo 1 и Evo 2), обученных на миллионах природных последовательностей ДНК, позволило успешно спроектировать функциональные геномы бактериофагов *de novo*. В ходе исследования было получено 16 жизнеспособных фагов с уникальными генетическими архитектурами, которые продемонстрировали высокую специфичность к хозяину и способность эффективно преодолевать бактериальную резистентность там, где природные штаммы оказывались неэффективными. Данная работа подтверждает возможность проектирования сложных биологических систем на уровне целых геномов под управлением ИИ, открывая новые перспективы для создания адаптивных антимикробных терапий и развития синтетической геномики.



King SH, Driscoll CL, Li DB, Guo D, Merchant AT, Brixi G, et al. Generative design of bacteriophages with genome language models. Science. 2026 Aug 6;393(6811):eaec2657. DOI: 10.1126/science.aec2657

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 132–139
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 132–139

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-132-139

Коклюш. Молекулярные особенности, эпидемиология и профилактика

Е.М.Глухая, О.Ю.Богданова, Т.Ф.Черных, О.М.Тихомирова

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

Коклюш – опасное инфекционное заболевание с высокой склонностью к эпидемическому распространению, которое, несмотря на имеющиеся в арсенале здравоохранения средства борьбы с ним, остается крайне острой проблемой. Среди причин всплесков уровня заболеваемости коклюшем – снижение поствакцинального иммунитета, разрастание антибиотикорезистентности возбудителя и его генетическая изменчивость, отказ от вакцинации части населения. Для понимания дальнейших стратегий профилактики и лечения коклюша необходимы систематизация и актуализация полученных в последние годы сведений о биологии возбудителя и эпидемиологии данной инфекции.

Цель работы. Систематизировать сведения о коклюше, биологии бактерий *Bordetella pertussis*; актуализировать эпидемиологические закономерности заболеваемости коклюшем; проанализировать новые тенденции в проведении специфической профилактики коклюшной инфекции.

Материалы и методы. Материалами исследований являлись современные научные публикации по теме обзора, опубликованные в научных информационных базах. Методы исследования – аналитический метод, метод классификации и систематизации данных.

Результаты. В работе проанализированы новые данные о биологии возбудителя коклюша, актуализированы сведения о заболеваемости и смертности от инфекции в мире и в России. Изучены перспективные направления в разработке вакцин и применения антибиотикотерапии.

Заключение. Анализ литературы подчеркивает важность будущих исследований коклюша, направленных на изучение безопасности, эффективности и рентабельности противококлюшных вакцин для оптимизации стратегий вакцинации, необходимость проведения генетического скрининга возбудителей, распространенных в регионах, анализ чувствительности возбудителя к назначаемым антибиотикам. Также крайне важна работа с населением в направлении популяризации вакцинирования и ревакцинирования против коклюша.

Ключевые слова: коклюш, бордетеллы, заболеваемость, профилактика, вакцины

Для цитирования: Глухая Е.М., Богданова О.Ю., Черных Т.Ф., Тихомирова О.М. Коклюш. Молекулярные особенности, эпидемиология и профилактика. Бактериология. 2026; 11(3): 132–139. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-132-139

Whooping cough. Molecular features, epidemiology and prevention

E.M.Glukhaya, O.Yu.Bogdanova, T.F.Chernykh, O.M.Tikhomirova

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

Whooping cough is a dangerous infectious disease with a high tendency to epidemic spread, which, despite the means available in the arsenal of healthcare to combat it, remains an extremely acute problem. Among the reasons for the spikes in the incidence of whooping cough are a decrease in post-vaccination immunity, the use of two types of vaccines, the proliferation of antibiotic resistance of the pathogen and its genetic variability, and the refusal to vaccinate part of the population. To understand further strategies for the prevention and treatment of whooping cough, it is necessary to systematize and update the information obtained in recent years about the biology of this infection.

The purpose of the work. To systematize information about whooping cough and the biology of *Bordetella pertussis* bacteria; to update the epidemiological patterns of whooping cough incidence; to analyze new trends in the specific prevention of whooping cough infection.

Materials and methods. The research materials were modern scientific publications on the subject of the review, published in information databases of scientific papers. The research methods in the work were the analytical method, the method of classification and systematization of data.

Для корреспонденции:

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

Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, лит. А
E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com
ORCID: 0009-0000-1539-8013

Статья поступила 02.03.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

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

Address: 14 lit. A Prof. Popov str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation
E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com
ORCID: 0009-0000-1539-8013

The article was received 02.03.2026, accepted for publication 30.09.2026

Results. The paper analyzes new data on the biology of the causative agent of whooping cough, updates information on morbidity and mortality from infection. Promising directions in the development of vaccines and the use of antibiotic therapy have been studied.
Conclusion. The literature analysis highlights the importance of future research aimed at studying the safety, effectiveness and cost-effectiveness of vaccines to optimize vaccination strategies, the need for genetic screening of pathogens common in regions, and the sensitivity of the pathogen to prescribed antibiotics. It is also extremely important to work with the population in the direction of popularization of vaccination and revaccination against whooping cough.
Key words: whooping cough, bordetella, morbidity, prevention, vaccines

For citation: Glukhaya E.M., Bogdanova O.Yu., Chernykh T.F., Tikhomirova O.M. Whooping cough. Molecular features, epidemiology and prevention. Bacteriology. 2026; 11(3): 132–139. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-132-139

Коклюш – бактериальная инфекция с респираторным механизмом передачи, вызываемая мелкими грамотрицательными бактериями *Bordetella pertussis*. Коклюш опасен для людей любых возрастов, наибольшую угрозу представляет для младенцев, что традиционно относит его к детским инфекциям. Наличие в арсенале профилактических средств противококлюшных вакцин двух типов относит коклюш к управляемым инфекциям. Однако современные вакцины против *B. pertussis* не предотвращают колонизацию и передачу бактерий, а иммунитет, вызванный вакциной, быстро ослабевает, что обостряет важность проблемы борьбы с этой инфекцией.

В последние годы накопилось значительное количество новых сведений о молекулярно-генетических, биохимических и физиологических особенностях бактерий *B. pertussis*, открыты эпидемиологические закономерности заболеваемости коклюшем, а также сформировались новые тенденции в противококлюшной вакцинации, что требует обновления и систематизации сведений об этой инфекции.

Цель работы: систематизировать сведения о коклюше, биологии бактерий *B. pertussis*; актуализировать эпидемиологические закономерности заболеваемости коклюшем; проанализировать новые тенденции в проведении специфической профилактики коклюшной инфекции.

Материалы и методы

Материалами исследований являлись современные научные публикации по теме обзора, опубликованные в информационных базах научных работ pubmed.gov, Medline, Google Scholar, frontiersin.org, biomedcentral.com, cyberleninka.ru, elibrary.ru и др. Всего проанализировано 55 научных публикаций, глубина поиска – 2019–2025 гг. (за исключением одной ключевой работы 2003 г.). Методы исследования – аналитический метод, метод классификации и систематизации данных.

Результаты исследования и их обсуждение

Определение. Коклюш (от фр. coqueluche – «петушок», символизирует ведущий симптом болезни – специфический кашель) – острое инфекционное антропонозное высококонтагиозное бактериальное заболевание, передающееся аэрогенным путем, характерным признаком которого является своеобразный приступообразный спазматический кашель.

Исторический аспект. Заболевание коклюша известно давно. Признаки коклюша упоминались в трудах Yuanfang Chao (Китай), написанных в VII веке, работах Абу Бакра Мухаммада ибн Закарии Ар-Рази (Разес) и Абу Али Хусейна ибн Абдуллаха ибн аль-Хасана ибн Али ибн Сины (Авиценны) (Персия) – в XI веке. Описания эпидемий коклюша были сделаны в Персии (Баха ад-Даула, 1484 г.), во Франции (de Bayou, 1578 г.), в Англии (Sydenham, 1679 г.), в России (Максимович-Амбодик, 1784 г.; Хотовицкий, 1847 г.). Наиболее подробное описание клинического течения коклюша представили Trousseau (1873 г., Франция), Филатов (1885 г., Россия), Воловик (1943 г., СССР). Выделение и описание возбудителя инфекции было проведено Bordet и Jangou (1906 г., Франция, Бельгия), в честь первого исследователя возбудитель получил свое название – бордетелла [1].

Первая противококлюшная инактивированная цельноклеточная вакцина была разработана Denmark (1926 г., США), комплексная вакцина против коклюша, дифтерии и столбняка (АКДС) была предложена и успешно применена Kendrick, Gordon, Elering (1930 г., США). Первая комбинированная вакцина была лицензирована к применению в США в 1948 г., в СССР – в 1949 г., с 1965 г. в СССР развернута широкомасштабная иммунизация населения ассоциированной вакциной (АКДС) [2].

В 2003 г. был раскрыт и опубликован полный геном бактерии *B. pertussis*. Изучение генетических особенностей бордетелл позволило выявить причины снижения иммуногенности вакцин и обусловило необходимость поиска новых средств борьбы с инфекцией. В настоящее время исследуется генетическое разнообразие штаммов бордетелл, которые обнаруживаются в разных странах и имеют генетические и антигенные различия [3, 4].

Таксономическое положение возбудителя коклюша. Возбудителем инфекции коклюша является бактерия B. pertussis (Moreno-Lorez, 1952), или палочка Борде–Жангу, относящаяся к роду *Bordetella*, семейству *Alcaligenaceae* (ранее относилась к семейству *Brucellaceae*), классу *Betaproteobacteria*, порядку *Burkholderiales*, типу *Pseudomonadati*, филуму *Pseudomonadota*. Бактерии рода *Bordetella* образуют близкородственную филогенетическую группу, включающую возбудителя инфекций у животных – *B. bronchiseptica*, а также возбудителя более легкого коклюшеподобного заболевания дыхательных путей у человека (паракоклюша) – *B. parapertussis*.

Род *Bordetella* включает 9 видов: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. ansorpii* и *B. petrii*. Все виды в той или иной степени имеют эпидемиологическое значение [1, 3].

Морфология возбудителя коклюша. Бактерия коклюша – мелкий палочковидный, несколько овоидный прокариот, имеющий клетку размером 0,2–0,5 × 1,0–1,2 мкм с закру-

гленными краями. Бактерия негативна по Граму, не образует эндоспор, но образует микрокапсулу и фимбрии.

B. pertussis ранее считалась неподвижной в отличие от *B. bronchiseptica*, которая кодирует и экспрессирует жгутиковый аппарат. Как показали исследования Hoffman et al. (2019), *B. pertussis* считалась неподвижным организмом, поскольку имеет стоп-кодон в гене жгутикового биосинтеза (*flhA*), при этом в геноме палочки Борде–Жангу содержится весь генетический материал, необходимый для синтеза и функционирования жгутиков, который по-разному регулируются в различных условиях роста (например, добавление фетальной бычьей сыворотки способствует подвижности). Было показано, что на поверхности *B. pertussis* имеются структуры, похожие на жгутики, однако их роль в инфекции пока не выяснена [5]. Таким образом, следует считать палочку коклюша способной к подвижности.

Физиология возбудителя коклюша. Палочка Борде–Жангу – мезофильная бактерия, растет при температуре 35–37°С, строго аэробна. Бактерия неустойчива к влияниям внешней среды – высокой температуре, прямым ультрафиолетовым лучам и традиционным дезинфектантам. При этом бактерии бордетеллы требовательны к питательным средам, что обуславливает применение для их культивирования картофельно-глицеринового агара с добавлением сыворотки крови человека или кроличьей плазмы. С биохимической точки зрения коклюшная палочка инертна, не ферментирует сахара и другие вещества.

Было показано, что *B. pertussis* имеет несколько дефектных метаболических путей, у нее нарушен гликолиз и для роста ей требуется ниацин. В качестве источника серы *B. pertussis* использует цистеин. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) *B. pertussis* долгое время считался частично нефункциональным [3]. Однако впоследствии было доказано, что ЦТК *B. pertussis* полностью функционирует в штамме Tohama I при использовании химически определенной среды, а кроме того, некоторые штаммы *B. pertussis* способны использовать в качестве источника серы тиосульфат [6]. Таким образом, метаболические возможности *B. pertussis* зависят от штамма и среды культивирования.

Факторы патогенности возбудителя коклюша. В процессе эволюции *B. pertussis* приобрела множество факторов вирулентности, которые делают ее чрезвычайно заразным патогеном, обладающим цепким механизмом адгезии к клеткам-мишеням – ресничному эпителию дыхательных путей. Основные факторы патогенности включают следующие субстанции [7]:

1. Токсины: термолабильный коклюшный экзотоксин (Ptx), включающий компонент А (S1-субъединица) (отвечает за токсичность инфекции), компонент В (S2-, S3-, S4-, S5-субъединицы), обеспечивает адгезию бактерий к эпителиоцитам. Бордетеллы также вырабатывают: 1) аденилатциклазный токсин – АДФ-рибозилирует Gαi-белки, тем самым влияя на ингибирование аденилатциклаз и приводя к накоплению цАМФ, чем нарушает метаболизм и функциональную активность клеток ресничного эпителия дыхательных путей макроорганизма; 2) липоолигосахарид (LOS) – имеет антигенный характер; 3) трахеальный цитотоксин – усиливает нарушение клеток эпителия; 4) дермонекротический токсин (DNT) – обуславливает формирование в кашлевом центре продолговатого мозга ствола устойчивого очага возбуждения, который вызывает развитие характерного для данной инфекции спазматического кашля. Комплекс коклюшных токсинов блокирует восприимчивость к гуморальным сигналам и угнетает функциональную активность клеточного звена иммунной системы, вызывая вторичный иммунодефицит. Scanlon et al. (2022) установили, что коклюшные токсины обуславливают развитие легочной гипертензии, ответственной за летальные исходы пациентов, и являются одной из важнейших терапевтических мишеней новых противококлюшных средств [8].

2. Филаментозный (нитевидный) гемагглютинин – поверхностный белок клетки *B. pertussis*, обеспечивающий адгезию бактерий к клеткам эпителия с помощью лектиноподобных участков, взаимодействующих с сульфатированными углеводами, и последовательности, которая распознает белки-рецепторы из семейства интегринов [9].

3. Пертактин – белок наружной мембраны клетки *B. pertussis*, участвует в адгезии бактерий к клеткам-мишеням, что также делает это вещество терапевтической мишенью [10].

4. Фимбрии (пили) – поверхностные структуры, обеспечивающие адгезию бактерий к клеткам-мишеням. Фимбрии образует фимбриальный белок Fim2, который закодирован геном *fim2* [11]. Фимбрии обладают высокой иммуногенностью и функционируют как адгезины [12].

Изученные факторы патогенности коклюшного возбудителя были положены в основу разработки противококлюшных вакцин, работа в данном направлении перспективна и продолжается.

Генетические особенности возбудителя коклюша. Геномы трех ключевых видов бордетелл включают от 3,8 до 5,0 тыс. пар оснований (п.о.) [3], при этом геном *B. pertussis* значительно уменьшился по сравнению с исходным видом *B. bronchiseptica* вследствие адаптации к одному виду-хозяину и потери способности к выживанию вне организма-хозяина [12]:

B. bronchiseptica RB50 – 5 338 400 п.о., 5007 генов;

B. parapertussis 12822 – 4 773 551 п.о., 4404 гена);

B. pertussis Tohama I – 4 086 186 п.о., 3816 генов.

В группе трех ключевых видов бактерии обладают двухкомпонентной регуляторной системой генов *BvgAS*, которая позволяет клеткам переключаться с вирулентной фазы Bvg+, в которой экспрессируются гены, ассоциированные с вирулентностью (*vags*), на авирулентную фазу Bvg–, в которой они подавляются. Регулятор вирулентности *B. pertussis* содержит >200 генов, среди которых имеются гены, кодирующие токсин и адгезины, а также механизмы их секреции. В фазе Bvg+ у коклюшного возбудителя система активна по умолчанию. Система BvgS реагирует на химические раздражители, такие как никотинат- и сульфат-ионы, температуру <25°С, что приводит к снижению ее активности и потере вирулентности. При промежуточных концентрациях модуляторов функционирует промежуточная фаза Bvgi, что приводит к выработке адгезинов, но не токсинов. Выявлены также и другие системы, регулирующие осмолярность, подвижность и в некоторых случаях вирулентность бордетелл, такие как RisA/S [12].

Генетические исследования *B. pertussis* активно продолжаются в связи с появлением новых методов секвени-

рования. Геномный анализ, предполагающий интеграцию более полных параметров хозяина и патогена, может предоставить новые возможности разработки новых видов вакцин и лекарственных средств борьбы с коклюшем [13]. Кроме того, исследователи отмечают необходимость регулярного определения генотипов циркулирующих среди населения штаммов *B. pertussis* [14, 15]. Это важно для своевременного выявления доминирующего штамма и его последующего применения для производства актуальной вакцины.

Эпидемиология коклюша. Коклюш долгое время считался детской инфекционной болезнью. Однако в 1990-е гг. произошло изменение возрастного распределения больных коклюшем в сторону возрастания заболеваемости среди подростков и взрослых. Причинами эпидемиологических изменений и «овзросления» коклюша следует считать:

- ослабление естественного и индуцированного вакциной иммунитета;
- улучшение общей клинической и лабораторной диагностики коклюша;
- рост врачебной настороженности в отношении коклюшной инфекции у подростков и взрослого населения;
- генетические мутации у бордетелл.

Возрастная структура заболеваемости коклюшем характеризуется следующими особенностями: 45–50% детей с инфекций имеют возраст до 1 года, 40–45% – возраст от 1 года до 6 лет. На долю детей школьного возраста и подростков 7–16 лет приходится 10–13%, с увеличением этой доли у населения, проживающего в сельской местности. Коклюш у новорожденных и младенцев может развиться на фоне отсутствия у них материнских противококлюшных антител, что обусловлено тем, что мать не болела коклюшем или не вакцинировалась. У младенцев заболевание нередко (до 70–73%) протекает тяжело, заканчиваясь летальным исходом. Профилактика коклюша у новорожденных и грудных младенцев должна включать обязательную вакцинацию проивококлюшной вакциной беременных женщин во II или III триместре беременности. Девочки в половой структуре заболеваемости коклюшем преобладают, достигая 60% всех заболевших [16].

Исследования свидетельствуют о классическом течении коклюша, в этом плане заболевание сохраняет традиционность. Среди заболевших детей доминируют клинические симптомы – спазматический кашель (100%), общая слабость (94%), заложенность носа (58%).

К факторам риска тяжелого течения коклюша следует относить новорожденность (недостаточность иммунной системы), отсутствие вакцинации у ребенка и/или у его матери в период беременности, паллиативный статус, сопутствующие иммунодефицитные состояния [1, 12, 17].

Включение вакцины АКДС в Расширенную программу иммунизации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 1974 г. значительно снизило заболеваемость коклюшем во всем мире. Однако с 1980-х гг. наблюдается рост заболеваемости коклюшем в странах с разным уровнем дохода населения. По данным ВОЗ, с 1980 по 2020 г. глобальная заболеваемость в целом снижалась, причем резкое снижение произошло с 1980 по 2000 г. После этого показатели заболеваемости стабилизировались на относительно низком уровне во всех регионах, хотя региональные различия сохранялись [18]. В последние годы исследователи фиксируют рост заболеваемости повсеместно [1, 12, 19]. В 2023 г. средний показатель заболеваемости коклюшем в мире составил 23,6 случая на 1 млн, с вариативностью по странам и регионам [20].

На Индию приходится 26,5% случаев заболевания коклюшем в мире. В Китае с 2016 г. (1,46 случая на 100 тыс. населения) по 2023 г. (14,22 случая на 100 тыс. населения) ежегодная заболеваемость коклюшем среди лиц в возрасте от 0 до 18 лет постепенно росла, а в 2024 г. резко подскочила до 512,56 случая на 100 тыс. населения [21].

В разных регионах показатели заболеваемости значительно отличаются. В Европе лидирует Хорватия с показателем 1233,6 случая на 1 млн населения, далее следуют Дания, Черногория и Австрия с показателями 1018,6; 661,4 и 305,6 случая на 1 млн человек соответственно.

В Германии в 2024 г. зарегистрирован 25 271 случай заболевания коклюшем в сравнении с 2023 г., когда было зафиксировано всего 3429 случая. Таким образом, заболеваемость в этой стране возросла более чем в 7 раз и остается на самом высоком уровне с 2013 г. [22].

В США заболеваемость коклюшем возросла в 8,7 раза – с 4083 случаев в 1992 г. до 35 435 в 2024 г. Периодические вспышки заболеваемости наблюдались в 2010, 2012–2014 и 2024 гг. [23].

В России заболеваемость коклюшем в настоящее время составляет 362,9 случая на 1 млн человек [24]. С 2002 по 2017 г. заболеваемость коклюшем в России не превышала в среднем 5,6 случая на 100 тыс. населения. В 2023 г. заболеваемость коклюшем достигла максимальных показателей за последние 22 года – 19,0 на 100 тыс. населения [24], рост в 3,4 раза.

Коклюш – одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний, становящихся причиной летальных исходов заболевших детей. Еще в СССР до появления и внедрения вакцины ежегодная заболеваемость коклюшем составляла порядка 600 тыс. Из этого числа летальных случаев было >5 тыс. (порядка 8%), при этом на первом году жизни летальность достигала 50–60% [25]. По данным ВОЗ за 2014 г., ежегодно в мире фиксировали 50 млн случаев коклюша, 300 тыс. из которых заканчивались смертью пациента. Согласно данным из большинства стран, число случаев смерти от коклюша растет [14].

Причины увеличения заболеваемости коклюшем:

- изначальная высокая вирулентность и контагиозность, генетическая изменчивость возбудителя [6, 7];
- смена вакцины с клеточной на бесклеточную, которая, по мнению части экспертов, обладает меньшей иммуногенностью [13];
- естественное ослабление иммунитета;
- недостаточный охват вакцинацией детей и беременных женщин вследствие антипрививочных движений, недостаточности финансирования и т.п.;
- низкий уровень ревакцинации;
- непродолжительность поствакцинального иммунитета [14];
- распространение штаммов *B. pertussis*, устойчивых к антибиотикам (в основном макролидам) [26];

- применение более чувствительных методов исследования (полимеразная цепная реакция, секвенирование нового поколения) [13];

Вакцинация против коклюша. Вакцинация против коклюша была введена почти 75 лет назад. Сначала использовалась цельноклеточная коклюшная вакцина (wP – от *англ.* whole cell pertussis), а затем бесклеточная вакцина (aP – от *англ.* acellular pertussis), которая содержит несколько очищенных антигенов бактерии. Благодаря меньшей реактогенности вакцины aP заменили традиционные вакцины wP во многих развитых странах, но в других регионах мира по-прежнему используются wP (например, в Польше). При этом безопасность обоих типов вакцин доказана как для детей, так и для беременных женщин [27].

Вакцины wP способствуют иммунологической поляризации в сторону Th1 и Th17 субпопуляций, в то время как aP способствуют Th2-реакции, которая более эффективна в снижении носительства, чем в предотвращении инфекции [28]. Бесклеточные коклюшные (aP) вакцины значительно снизили глобальную заболеваемость тяжелым коклюшем. Однако их ограниченная способность вызывать иммунитет на слизистых оболочках и обеспечивать длительную защиту связана с ослаблением иммунитета и продолжающейся циркуляцией *B. pertussis* [19]. Таким образом, следует отметить значительное продвижение в понимании механизмов иммунной защиты от коклюша. Кроме того, долгое время остававшийся противоречивым вопрос распространения поствакцинального иммунитета на паракоклюшную инфекцию разрешился. В работе Remesh et al. (2024) показана эффективность противококлюшных вакцин против *B. parapertussis*: для aP – 66%, для wP – 82%, что делает возможным формирование перекрестного иммунитета [20].

Откликом на активное внедрение и применение бесклеточных вакцин стал сдвиг в возрастной структуре заболеваемости коклюшем в сторону большей доли заболевших среди старших возрастных групп – подростков, молодых людей и взрослых [29].

Наряду с этим проблема реактогенности обычных wP может быть решена путем генетической модификации штаммов *B. pertussis*, продуцирующих белки фимбрий Fim2 и Fim3, которые используются для производства цельноклеточных коклюшных вакцин. В исследовании Škopová et al. (2025) в геномы вакцинных штаммов были внесены мутации, которые: 1) снижают сигнальную активность TLR4 липида A LOS *B. pertussis* (ΔlgmB); 2) устраняют ферментативную (иммуносупрессивную) активность коклюшного токсина (PtxS1-R9K/E129G); 3) подавляют выработку DNT [30].

Одним из направлений разработки новых вакцин является использование везикул внешней мембраны (BMB), которые способны переносить иммуногенные структуры, такие как токсины и LOS. Исследования с использованием BMB различных штаммов *B. pertussis* показали многообещающие результаты при заражении животных и в доклинических исследованиях на людях [31].

Рекомендуемой вакциной от коклюша для детей остается ассоциированная вакцина АКДС (коклюш, дифтерия, столбняк). Дети должны получить серию из 5 прививок в возрасте от 2, 4, 6 и 15 до 18 мес. Также необходима ревакцинация в возрасте от 4 до 6 лет. Подростки должны быть вакцинированы в 11 или 12 лет. Взрослые в возрасте 19 лет и старше должны получить прививку АКДС вместо прививок от столбняка, которые должны быть сделаны каждые 10 лет. Беременные женщины должны пройти вакцинацию (или ревакцинацию) в начале III триместра, с 27-й по 36-ю неделю беременности [32].

Лечение коклюша. Пациентов с подтвержденной коклюшной инфекцией лечат антибиотиками. Раннее лечение младенцев с коклюшем кларитромицином или азитромицином улучшает клинические симптомы. Кларитромицин в борьбе с коклюшем может быть более эффективным, чем азитромицин. Своевременное назначение антибиотиков также может помочь предотвратить распространение заболевания во время новой вспышки коклюша, и их следует назначать независимо от результатов лабораторных исследований, принимая во внимание возможные побочные эффекты ненужной терапии [33]. Учитывая нарастающую устойчивость бордетелл к макролидам, следует параллельно или до лечения проводить скрининг устойчивости возбудителей к антибиотикам [34].

Заключение

В структуре заболеваемости управляемыми инфекциями коклюш занимает одно из ведущих мест в мире и в России. В этой связи крайне важными могут быть исследования биологии возбудителя, профилактики и лечения болезни.

К настоящему времени в ряде фундаментальных исследований показаны наличие у *B. pertussis* способности к подвижности, зависимость физиологии бактерий от химического состава питательной среды и условий культивирования. В достаточной степени изучены геном и генетическая изменчивость штаммов в зависимости от региона. Глубокое исследование факторов патогенности возбудителя коклюша дает возможность поиска новых возможностей вакцинации и поиска терапевтических средств.

Анализ литературы подчеркивает важность будущих исследований, направленных на изучение безопасности, эффективности и рентабельности вакцин для оптимизации стратегий вакцинации, необходимость проведения генетического скрининга возбудителей, распространенных в регионах, анализа чувствительности возбудителя к назначаемым антибиотикам. Также крайне важна работа с населением в направлении популяризации вакцинирования и ревакцинирования против коклюша.

Источники финансирования

Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования и подготовке публикации.

Funding

No funding was received for conducting this study and preparing the manuscript for publication.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Глухая Е.М. – работа с литературными источниками, написание текста статьи;

Богданова О.Ю., Тихомирова О.М. – сбор и анализ данных;

Черных Т.Ф. – редактирование текста, концепция и дизайн исследования.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contribution

Glukhaya E.M. – literary review, article writing;

Bogdanova O.Yu., Tikhomirova O.M. – data collection and analysis;

Chernykh T.F. – text editing, study conception and design.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Бабаченко ИВ. Клинико-эпидемиологическая эволюция коклюша на фоне массовой вакцинопрофилактики. Поликлиника. 2021;1:57-63.
2. Комаровская ЕИ, Проскурина ОВ, Солдатов АА. Эволюция АКДС-вакцины: разнообразие составов, трудности стандартизации, перспективы развития. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2025;25(1):83-96. DOI: 10.30895/2221-996X-2025-25-1-83-96
3. Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet. 2003 Sep;35(1):32-40. DOI: 10.1038/ng1227
4. Payne M, Xu Z, Hu D, Kaur S, Octavia S, Sintchenko V et al. Genomic epidemiology and multilevel genome typing of *Bordetella pertussis*. Emerg Microbes Infect. 2023;12(2):2239945. DOI: 10.1080/22221751.2023.2239945
5. Hoffman CL, Gonyar LA, Zacca F, Sisti F, Fernandez J, Wong T, et al. *Bordetella pertussis* Can Be Motile and Express Flagellum-Like Structures. mBio. 2019 May 14;10(3):e00787-19. DOI: 10.1128/mBio.00787-19
6. Belcher T, Dubois V, Rivera-Millot A, Locht C, Jacob-Dubuisson F. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. Virulence. 2021;12(1):2608-2632. DOI: 10.1080/21505594.2021.1980987
7. Ernst K, Mittler AK, Winkelmann V, Kling C, Eberhardt N, Anastasia A, et al. Pharmacological targeting of host chaperones protects from pertussis toxin *in vitro* and *in vivo*. Sci Rep. 2021;11(1):5429. DOI: 10.1038/s41598-021-84817-2
8. Scanlon KM, Chen L, Carbonetti NH. Pertussis Toxin Promotes Pulmonary Hypertension in an Infant Mouse Model of *Bordetella pertussis* Infection. J Infect Dis. 2022;225(1):172-176. DOI: 10.1093/infdis/jiab325
9. Otsuka N, Koide K, Goto M, Kamachi K, Kenri T. Fim3-dependent autoagglutination of *Bordetella pertussis*. Sci Rep. 2023;13(1):7629. DOI: 10.1038/s41598-023-34672-0
10. Espinosa-Vinals C, Holubova J, Stanek O, Osicka R, Masin J, Arellano Herencia FE, et al. Intranasal application of a bifunctional pertactin-RTX fusion antigen elicits protection of mouse airway mucosa against *Bordetella pertussis* colonization. mSphere. 2025;10(4):e0095924. DOI: 10.1128/msphere.00959-24
11. Борисова ОЮ, Андриевская ИЮ, Пименова АС, Гадуа НТ, Чагина ИА, Борисова АБ и др. Генотипическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis* – кандидатов для получения коклюшного компонента вакцинных препаратов (сообщение I). Вестник РГМУ. 2024;2:4-10. DOI: 10.24075/vrgmu.2024.017
12. Domenech de Cellès M, Rohani P. Pertussis vaccines, epidemiology and evolution. Nat Rev Microbiol. 2024;22(11):722-735. DOI: 10.1038/s41579-024-01064-8
13. Cameron SK, Preston A. A role for genomics-based studies of *Bordetella pertussis* adaptation. Curr Opin Infect Dis. 2025;38(3):201-207. DOI: 10.1097/QCO.0000000000001109
14. Бажанова ИГ, Брицина МВ, Мерцалова НУ, Озерецковская МН. Генетическая изменчивость *Bordetella pertussis* и ее роль в вакцинопрофилактике коклюша. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019;4:98-105. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-98-105
15. Россина АЛ, Чуелов СБ, Кондратенко НВ, Гужавина АА, Жиркова ЮВ, Фомушкина АА, и др. Коклюш у новорожденных. Детские инфекции. 2025;1:33-36. DOI: 10.22627/2072-8107-2025-24-1-33-36
16. Эрматов БС. Анализ заболеваемости коклюшем в зависимости от пола и возраста. Экономика и социум. 2025;1-1(128):620-624.
17. Пестова АС, Аминова АИ, Акопян АС, Бердников ГВ, Грузинцева АА. Злокачественный коклюш у паллиативного пациента. Клинический разбор в общей медицине. 2023;4(11):38-40. DOI: 10.47407/kr2023.4.11.00302
18. Liu Y, Yu D, Wang K, Ye Q. Global resurgence of pertussis: A perspective from China. J Infect. 2024;89(5):106289. DOI: 10.1016/j.jinf.2024.106289
19. Locati L, Bottero D, Carriquiriborde F, López O, Pschunder B, Zurita E, et al. Harnessing outer membrane vesicles derived from *Bordetella pertussis* to overcome key limitations of acellular pertussis vaccines. Front Immunol. 2025;16:1655910. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1655910
20. Remesh AT, Alagarasu K, Jadhav S, Prabhakar M, Viswanathan R. Pertussis Vaccines Scarcely Provide Protection against *Bordetella parapertussis* Infection in Children – A Systematic Review and Meta-Analysis. Vaccines. 2024;12(3):253. DOI: 10.3390/vaccines12030253
21. Gao K, Zhu Y, Zhou Y, Ding L, Liang H, He H, et al. Pertussis resurgence and epidemiology of fully vaccinated cases in eastern China: evidence for vaccination timing. Front Public Health. 2025;13:1677699. DOI: 10.3389/fpubh.2025.1677699
22. Deutscher Bundestag – Mehr Fälle von Keuchhusten 2024 [Electronic resource]. Available at: https://www.bundestag.de/presse/hib/kurzmeldungen-1082540 (accessed 02.11.2025).
23. Parikh J, Hoare I, Izurieta R. Evaluating the Relationship Between the Introduction of the Acellular Pertussis Vaccine and Whooping Cough Resurgence in the United States. Vaccines (Basel). 2025;13(8):841. DOI: 10.3390/vaccines13080841
24. Басов АА, Высочанская СО, Цвиркун ОВ, Белова ТР, Адугюзелов СЭ, Жернов ЮВ, и др. Критерии оценки эпидемиологической ситуации по коклюшу в Российской Федерации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2024;23(1):4-13. DOI: 10.31631/2073-3046-2024-23-1-4-13
25. Алексеева ИА, Перелыгина ОВ, Никитюк НФ, Обухов ЮИ, Гаврилова НА, Колышкина ЕД, и др. Заболеваемость коклюшем в России, ее причины и пути снижения. Медицинский альманах. 2019;3-4(60):24-32. DOI: 10.21145/2499-9954-2019-3-24-32

26. Rosca I, Turenschi A, Dinulescu A, Lichii V. The Re-Emergence of Pediatric Pertussis: Insights from a Regional Romanian Hospital. Antibiotics (Basel). 2025 Jul 21;14(7):730. DOI: 10.3390/antibiotics14070730
27. Батраханов АР, Шахбанова ПС, Подпругина СВ, Майльянц ЭА, Саруханян СС. Оценка эффективности вакцин против коклюша у взрослых: особенности иммунного ответа и значение ревакцинации (научное исследование, базирующееся на всестороннем, глубоком анализе данных современной литературы). Laboratory Diagnostics Eastern Europe. 2025;14(1):26-36. DOI: 10.34883/PI.2025.14.1.002
28. Duda-Madej A, Łabaz J, Topola E, Bazan H, Viscardi S. Pertussis – A ReEmerging Threat Despite Immunization: An Analysis of Vaccine Effectiveness and Antibiotic Resistance. Int J Mol. Sci. 2025;26(19):9607. DOI: 10.3390/ijms26199607
29. Sheng Y, Ma S, Zhou Q, Xu J. Pertussis resurgence: epidemiological trends, pathogenic mechanisms, and preventive strategies. Front Immunol. 202510;16:1618883. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1618883
30. Škopová K, Holubová J, Bočková B, Slivenecká E, Santos de Barros JM, Staněk O, et al. Less reactogenic whole-cell pertussis vaccine confers protection from *Bordetella pertussis* infection. mSphere. 2025;10(4):e0063924. DOI: 10.1128/msphere.00639-24
31. Yılmaz Çolak Ç, Tefon Öztürk BE. *Bordetella pertussis* and outer membrane vesicles. Pathog Glob Health. 2023;117(4):342-355. DOI: 10.1080/20477724.2022.2117937
32. Геппе НА, Малахов АБ. Согласованное мнение экспертов по вопросам организации вакцинации против коклюша XI образовательного международного консенсуса по респираторной медицине в педиатрии. Педиатрия. Consilium Medicum. 2022;4:328-333. DOI: 10.26442/26586630.2022.4.201954
33. Tozzi AE, Croci I, Gesualdo F, Perno CF, Linardos G, Villani A, et al. Effect of Early Administration of Clarithromycin or Azithromycin on Symptoms of Pertussis in Infants. Antibiotics (Basel). 2025;14(3):279. DOI: 10.3390/antibiotics14030279
34. Ivaska L, Barkoff AM, Mertsola J, He Q. Macrolide Resistance in *Bordetella pertussis*: Current Situation and Future Challenges. Antibiotics (Basel). 2022;11(11):1570. DOI: 10.3390/antibiotics11111570

References

1. Babachenko IV. Clinical and epidemiological evolution of whooping cough against the background of mass vaccination. Poliklinika. 2021;1:57-63. (In Russian).
2. Komarovskaya EI, Proskurina OV, Soldatov AA. DPT vaccine evolution: Formulation differences, standardisation issues, and development prospects. Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2025;25(1):83-96. DOI: 10.30895/2221-996X-2025-25-1-83-96 (In Russian).
3. Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet. 2003 Sep;35(1):32-40. DOI: 10.1038/ng1227
4. Payne M, Xu Z, Hu D, Kaur S, Octavia S, Sintchenko V, et al. Genomic epidemiology and multilevel genome typing of *Bordetella pertussis*. Emerg Microbes Infect. 2023;12(2):2239945. DOI: 10.1080/22221751.2023.2239945
5. Hoffman CL, Gonyar LA, Zacca F, Sisti F, Fernandez J, Wong T, et al. *Bordetella pertussis* Can Be Motile and Express Flagellum-Like Structures. mBio. 2019 May 14;10(3):e00787-19. DOI: 10.1128/mBio.00787-19
6. Belcher T, Dubois V, Rivera-Millot A, Locht C, Jacob-Dubuisson F. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. Virulence. 2021;12(1):2608-2632. DOI: 10.1080/21505594.2021.1980987
7. Ernst K, Mittler AK, Winkelmann V, Kling C, Eberhardt N, Anastasia A, et al. Pharmacological targeting of host chaperones protects from pertussis toxin *in vitro* and *in vivo*. Sci Rep. 2021;11(1):5429. DOI: 10.1038/s41598-021-84817-2
8. Scanlon KM, Chen L, Carbonetti NH. Pertussis Toxin Promotes Pulmonary Hypertension in an Infant Mouse Model of *Bordetella pertussis* Infection. J Infect Dis. 2022;225(1):172-176. DOI: 10.1093/infdis/jiab325
9. Otsuka N, Koide K, Goto M, Kamachi K, Kenri T. Fim3-dependent autoagglutination of *Bordetella pertussis*. Sci Rep. 2023;13(1):7629. DOI: 10.1038/s41598-023-34672-0
10. Espinosa-Vinals C, Holubova J, Stanek O, Osicka R, Masin J, Arellano Herencia FE, et al. Intranasal application of a bifunctional pertactin-RTX fusion antigen elicits protection of mouse airway mucosa against *Bordetella pertussis* colonization. mSphere. 2025;10(4):e0095924. DOI: 10.1128/msphere.00959-24
11. Borisova OYu, Andrievskaya IYu, Pimenova AS, Gadua NT, Chagina IA, Borisova AB, et al. Genotypic characteristics of *Bordetella pertussis*, candidate strains for production of pertussis component of vaccines (Statement I). Bulletin of RSMU. 2024;2:4-10. DOI: 10.24075/vrgmu.2024.017 (In Russian).
12. Domenech de Cellès M, Rohani P. Pertussis vaccines, epidemiology and evolution. Nat Rev Microbiol. 2024;22(11):722-735. DOI: 10.1038/s41579-024-01064-8
13. Cameron SK, Preston A. A role for genomics-based studies of *Bordetella pertussis* adaptation. Curr Opin Infect Dis. 2025;38(3):201-207. DOI: 10.1097/QCO.0000000000001109
14. Bazhanova IG, Britsina MV, Mertsalova NU, Ozeretskovskaya MN. Genetic variability of *Bordetella pertussis* and its role in vaccine prevention of pertussis. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2019;4:98-105. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-98-105 (In Russian).
15. Rossina AL, Chuelov SB, Kondratenko NV, Guzhavina AA, Zhirkova YuV, Fomushkina AA, et al. Whooping cough in newborns. Children Infections. 2025;1:33-36. DOI: 10.22627/2072-8107-2025-24-1-33-36 (In Russian).
16. Ermatov BS. The relationship between whooping cough incidence and gender and age. Economy and Society. 2025;1-1(128):620-624. (In Russian).
17. Pestova AS, Aminova AI, Akopyan AS, Berdnikov GV, Gruzintseva AA. Malignant whooping cough in a palliative patient. Clinical Review for General Practice. 2023;4(11):38-40. DOI: 10.47407/kr2023.4.11.00302 (In Russian).
18. Liu Y, Yu D, Wang K, Ye Q. Global resurgence of pertussis: A perspective from China. J Infect. 2024;89(5):106289. DOI: 10.1016/j.jinf.2024.106289
19. Locati L, Bottero D, Carriquiriborde F, López O, Pschunder B, Zurita E, et al. Harnessing outer membrane vesicles derived from *Bordetella pertussis* to overcome key limitations of acellular pertussis vaccines. Front Immunol. 2025;16:1655910. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1655910
20. Remesh AT, Alagarasu K, Jadhav S, Prabhakar M, Viswanathan R. Pertussis Vaccines Scarcely Provide Protection against *Bordetella parapertussis* Infection in Children – A Systematic Review and Meta-Analysis. Vaccines. 2024;12(3):253. DOI: 10.3390/vaccines12030253
21. Gao K, Zhu Y, Zhou Y, Ding L, Liang H, He H, et al. Pertussis resurgence and epidemiology of fully vaccinated cases in eastern China: evidence for vaccination timing. Front Public Health. 2025;13:1677699. DOI: 10.3389/fpubh.2025.1677699
22. Deutscher Bundestag – Mehr Fälle von Keuchhusten 2024 [Electronic resource]. Available at: https://www.bundestag.de/presse/hib/kurzmeldungen-1082540 (accessed 02.11.2025).
23. Parikh J, Hoare I, Izurieta R. Evaluating the Relationship Between the Introduction of the Acellular Pertussis Vaccine and Whooping Cough Resurgence in the United States. Vaccines (Basel). 2025;13(8):841. DOI: 10.3390/vaccines13080841
24. Basov AA, Vysochanskaya SO, Tsvirkun OV, Belova TR, Aduguzelov SE, Zhernov YV, et al. Criteria for Assessing the Epidemiological Situation of Pertussis in Russian Federation. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2024;23(1):4-13. DOI: 10.31631/2073-3046-2024-23-1-4-13 (In Russian).
25. Alekseeva IA, Perelyigina OV, Nikituk NF, Obuchov YuI, Gavrilova NA, Kolyshkina ED, et al. Incidence of whooping cough in Russia, its causes and ways to reduce. Medical Almanac. 2019;3-4(60):24-32. DOI: 10.21145/2499-9954-2019-3-24-32 (In Russian).
26. Rosca I, Turenschi A, Dinulescu A, Lichii V. The Re-Emergence of Pediatric Pertussis: Insights from a Regional Romanian Hospital. Antibiotics (Basel). 2025 Jul 21;14(7):730. DOI: 10.3390/antibiotics14070730

27. Batrakhanov AR, Shakhbanova PS, Podprugina SV, Mail'yants EA, Sarukhanyan SS. Evaluation of Pertussis Vaccines Effectiveness in Adults: Immune Response Features and Revaccination Importance (a Scientific Study Based on a Comprehensive, InDepth Analysis of Modern Literature Data). Laboratory Diagnostics Eastern Europe. 2025;14(1):26-36. DOI: 10.34883/PI.2025.14.1.002 (In Russian).
28. Duda-Madej A, Łabaz J, Topola E, Bazan H, Viscardi S. Pertussis – A ReEmerging Threat Despite Immunization: An Analysis of Vaccine Effectiveness and Antibiotic Resistance. Int J Mol. Sci. 2025;26(19):9607. DOI: 10.3390/ijms26199607
29. Sheng Y, Ma S, Zhou Q, Xu J. Pertussis resurgence: epidemiological trends, pathogenic mechanisms, and preventive strategies. Front Immunol. 202510;16:1618883. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1618883
30. Škopová K, Holubová J, Bočková B, Slivenecká E, Santos de Barros JM, Staněk O, et al. Less reactogenic whole-cell pertussis vaccine confers protection from *Bordetella pertussis* infection. mSphere. 2025;10(4):e0063924. DOI: 10.1128/msphere.00639-24
31. Yılmaz Çolak Ç, Tefon Öztürk BE. *Bordetella pertussis* and outer membrane vesicles. Pathog Glob Health. 2023;117(4):342-355. DOI: 10.1080/20477724.2022.2117937
32. Geppe NA, Malakhov AB. Agreed Expert Opinion of the XI Educational International Consensus on Respiratory Medicine in Pediatrics on the organization of pertussis vaccination. Pediatrics. Consilium Medicum. 2022;4:331-334. DOI: 10.26442/26586630.2022.4.201954 (In Russian).
33. Tozzi AE, Croci I, Gesualdo F, Perno CF, Linardos G, Villani A, et al. Effect of Early Administration of Clarithromycin or Azithromycin on Symptoms of Pertussis in Infants. Antibiotics (Basel). 2025;14(3):279. DOI: 10.3390/antibiotics14030279
34. Ivaska L, Barkoff AM, Mertsola J, He Q. Macrolide Resistance in *Bordetella pertussis*: Current Situation and Future Challenges. Antibiotics (Basel). 2022;11(11):1570. DOI: 10.3390/antibiotics11111570

Информация о соавторах:

Глухая Елизавета Михайловна, магистрант 3-го года ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России

Богданова Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России
ORCID: 0000-0002-4492-6599

Тихомирова Ольга Михайловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России
ORCID: 0000-0001-5210-8329

Information about co-authors:

Elizaveta M. Glukhaya, 3rd year master's student at the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Olga Yu. Bogdanova, PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Department of Microbiology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
ORCID: 0000-0002-4492-6599

Olga M. Tikhomirova, PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Department of Microbiology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
ORCID: 0000-0001-5210-8329

Как кофе на самом деле влияет на ваш кишечник и мозг



Проанализировано влияние кофе на ось двусторонний канал связи между микробиомом кишечника и мозгом и оценено, проявляются ли эти эффекты у здоровых людей независимо от содержания в кофе кофеина. Основными показателями исследования стали состав и функции микробиоты, а дополнительными – метаболиты кишечной микробиоты и соединения, связанные с употреблением кофе. У тех, кто употребляет кофе, наблюдалось повышенное относительное содержание бактерий родов *Cryptobacterium* и *Eggerthella*, а также снижение уровня индол-3-пропионовой кислоты и индол-3-карбоксальдегида, а также нейромедиатора – гамма-аминомасляной кислоты. У любителей кофе отмечались более выраженная импульсивность и эмоциональная реактивность, в то время как у тех, кто не пьет кофе, показатели памяти оказались лучше. Некоторые изменения в метаболоме кала были обратимыми при отказе от кофе, а его повторное введение вызывало резкие изменения в микробиоме, не зависящие от наличия кофеина. Было выделено девять ключевых метаболитов (включая теофиллин, кофеин и некоторые фенольные кислоты), которые тесно связаны как с видами микроорганизмов, так и с когнитивными показателями. Полученные результаты раскрывают ранее неизвестные аспекты влияния кофе на ось «микробиота – кишечник – головной мозг», указывая на то, что профили микробиома могут служить предикторами характера потребления кофе, а также подчеркивая тесную взаимосвязь между употреблением этого напитка и составом кишечной микробиоты.

Boscaini S, Bastiaanssen TFS, Moloney GM, Bergamo F, Zeraik L, O'Leary C, et al. Habitual coffee intake shapes the gut microbiome and modifies host physiology and cognition. Nat Commun. 2026 Apr 21;17(1):3439. DOI: 10.1038/s41467-026-71264-8

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 140–146
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 140–146

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-140-146

Геномы штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов нейрореанимации в Москве в 2012–2021 гг.

М.В.Фурсов[1], Т.С.Новикова[1], А.Е.Соломенцева[1], Д.В.Волков[1], О.О.Доброхотский[1], О.Н.Ершова[2], Н.К.Фурсова[1]

[1]ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;
[2]ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Исследование посвящено полногеномному секвенированию и анализу геномов 357 изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в отделении нейрореанимации г. Москвы в 2012–2021 гг. Показано, что изучаемая популяция бактерий в значительной степени гетерогенна – идентифицированы 63 генетических линии (ST/KL) с преобладанием ST395/KL2 (18% изолятов). Анализ резистомов и вируломов изучаемых изолятов выявил принадлежность большей их части к конвергентным генетическим линиям MDR-hvKp.
Ключевые слова: Klebsiella pneumoniae, WGS, резистом

Для цитирования: Фурсов М.В., Новикова Т.С., Соломенцева А.Е., Волков Д.В., Доброхотский О.О., Ершова О.Н., Фурсова Н.К. Геномы штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов нейрореанимации в Москве в 2012–2021 гг. Бактериология. 2026; 11(3): 140–146. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-140-146

Genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients of neuro-ICU in Moscow in 2012–2021

M.V.Fursov[1], T.S.Novikova[1], A.E.Solomentseva[1], D.V.Volkov[1], O.N.Ershova[2], N.K.Fursova[1]

[1]State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation;
[2]Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Moscow, Russian Federation

This study focuses on the whole-genome sequencing and analysis of 357 *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in a neuro-intensive care unit in Moscow between 2012 and 2021. The bacterial population was found to be highly heterogeneous, with 63 genetic lineages (ST/KL) identified, the most prevalent being ST395/KL2 (18% of isolates). Analysis of the resistomes and virulomes revealed that the majority of the isolates belonged to convergent MDR-hvKp genetic lineages.
Key words: Klebsiella pneumoniae, WGS, резистом

For citation: Fursov M.V., Novikova T.S., Solomentseva A.E., Volkov D.V., Ershova O.N., Fursova N.K. Genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients of neuro-ICU in Moscow in 2012–2021. Bacteriology. 2026; 11(3): 140–146. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-140-146

Устойчивость возбудителей инфекций человека к антимикробным препаратам представляет собой одну из серьезнейших угроз для общественного здравоохранения во всем мире, особенно в связи с повсеместным распространением бактериальных патогенов с множественной (MDR), экстремальной (XDR) и тотальной лекарственной устойчивостью [1].

Объектом данного исследования являлись 357 антибиотикорезистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от 295 пациентов отделения нейрореанимации г. Москвы

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-00
E-mail: fursov@obolensk.org
ORCID: 0000-0001-9137-9551

Статья поступила 10.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-00
E-mail: fursov@obolensk.org
ORCID: 0000-0001-9137-9551

The article was received 10.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

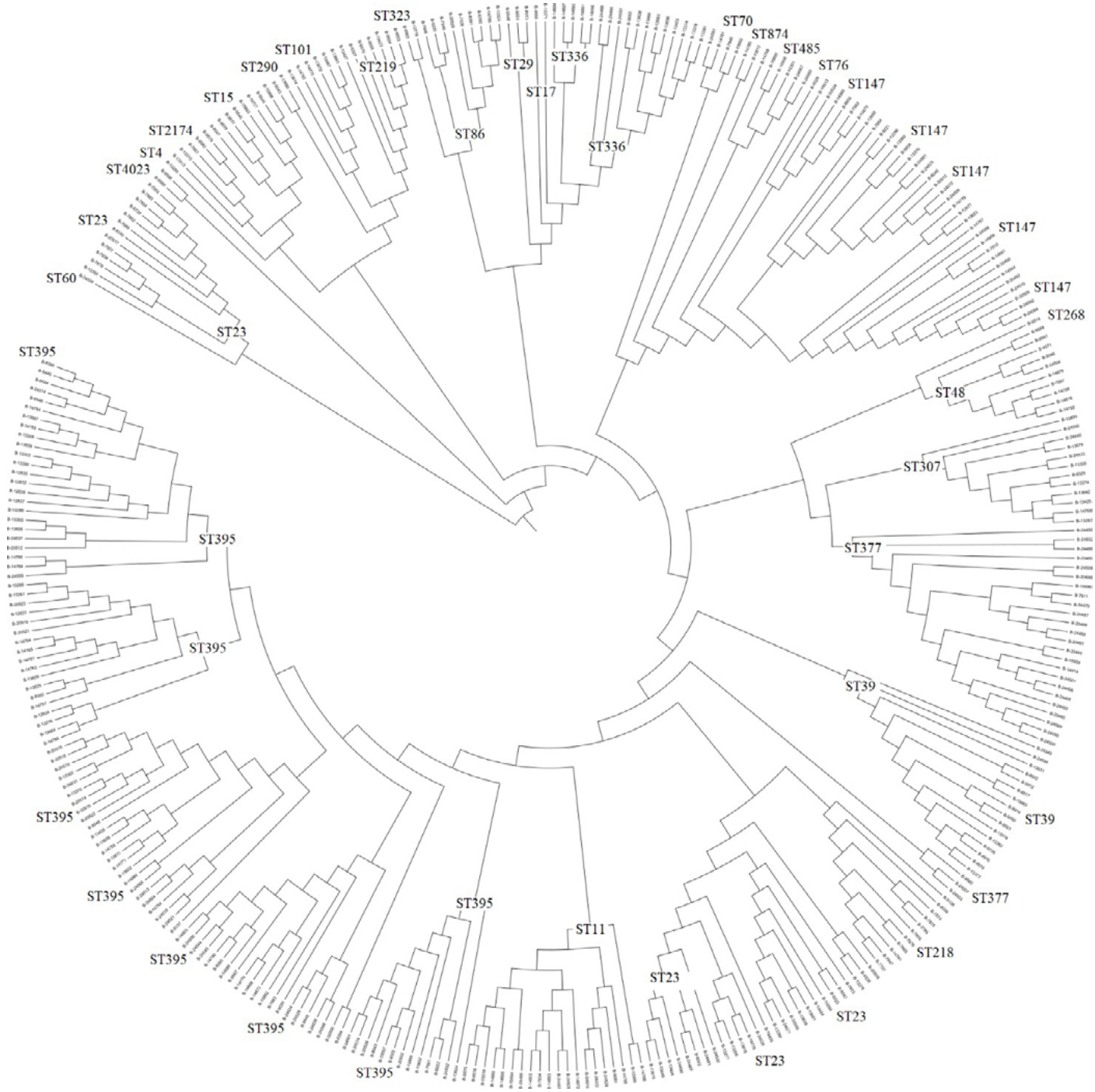


Рисунок. **Филогенетическое дерево, построенное на основании 357 полногеномных последовательностей штаммов *K. pneumoniae* с помощью алгоритмов Snippy и IQTree.**
Figure. ***Phylogenetic tree constructed based on 357 whole-genome sequences of K. pneumoniae strains using the Snippy and IQTree algorithms.***

в 2012–2021 гг., включенных в исследование по следующим критериям: выделение от разных пациентов, в разные даты или из разных сайтов организма человека.

Бактериальные культуры выращивали при температуре 37°С на питательных средах «ГРМ №1» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и «Mueller–Hinton broth» (Himedia, Мумбаи, Индия), хранили в 20%-м глицерине при температуре -70°С. Идентификацию бактерий осуществляли с использованием приборов Vitek-2 Compact (bioMérieux, Craponne, Франция) и MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) определяли на приборе Vitek-2 Compact (bioMérieux, Craponne, Франция), интерпретировали в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [2]. На основании критериев Magiorakos et al. [3] большинство изучаемых изолятов K. pneumoniae отнесены к группам MDR (n = 179, 50%) и XDR (n = 159, 45%), остальные – к группе устойчивых к одному классу АМП (n = 19,5%).

Выделение бактериальной ДНК проводили с использованием метода на основе цетил-триметиламмоний-бромида [4]. Количество и качество ДНК определяли спектрофото-

Таблица. **Геномы штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов нейрореанимации г. Москвы в 2012–2021 гг.**
Table. ***Genomes of K. pneumoniae strains isolated from neuro-ICU patients in Moscow, 2012–2021***

Годы	Кол-во штаммов	ST (кол-во)	K-типы (кол-во)	Коды доступа геномов в базе данных GenBank	Полнота генома, %	Загрязнение генома, %	Размер генома, п.о.	GC-состав, %	Кол-во контигов	Кол-во генов
2012	3	ST395 (2), ST23 (1)	K1 (1), K2 (1), K47 (1)	SAMN63814501, NZ_JADOEV000000000, JADEZB000000000	100,00–100,00	0,10–1,08	5 575 950–5 830 430	57–57	124–324	5345–5655
2013	24	ST218 (9), ST395 (4), ST23(3), ST48 (3), ST11 (2), ST147 (1), ST3798 (1), ST565 (1)	K57 (9), K2 (4), K1 (3), K62 (3), K24 (2), K31 (1), K47 (1) K64 (1)	JBXPXK010000000, JBXPXJ010000000, JBXPXI010000000, SAMN63814503, SAMN63814505, SAMN63814506, SAMN63814507, SAMN63814508, SAMN63814502, NZ_JADOFB000000000, NZ_JADEYY000000000, NZ_JADEZL000000000, NZ_MCNN00000000, NZ_JADOEW000000000, NZ_JADOEX000000000, SAMN63814504, NZ_JADEYZ000000000, NZ_JADEZC000000000, NZ_JADEZK000000000, NZ_JADOFG000000000, NZ_JADEZM000000000, NZ_QIUF00000000, VKCT00000000	99,99–100,00	0,09–2,18	5 281 651–5 914 781	57–57	68–497	4 950–5713
2014	52	ST395 (12), ST147 (9), ST23(7), ST336 (5), ST11 (4), ST377 (3), ST15 (3), ST48 (2), ST485 (2), ST86 (2), ST218 (1), ST307 (1), ST2174 (1),	K2 (13), KL183 (7), K10 (5), K1 (4), K64 (4), K27 (3), KL102 (3), K57 (2), K62 (2), K14 (1), K19 (1), K24 (1), K39 (1), K47 (1), K60 (1), KL146 (1), ND (2)	SAMN63814509VTRN00000000, SAMN63814510, SAMN63814511, SAMN63814512, SAMN63814513, SAMN63814514, SAMN63814515, JBXPXB010000000, JBXPXA000000000, SAMN63814516, SAMN63814517, SAMN63814518, SAMN63814519, SAMN63814520, SAMN63814521, SAMN63814522, JBXPWY010000000, SAMN63814523, SAMN63814524, SAMN63814525, SAMN63814526, JBXPWV010000000, SAMN63814527, JBXPWU010000000, SAMN63814528, SAMN63814529, SAMN63814530, SAMN63814531, SAMN63814532, SAMN63814533, SAMN63814534, SAMN63814535, JBXPWT010000000, NZ_QIUI01000000, JBXPWZ000000000, JADOFI010000000, NZ_NIDM00000000, NZ_PUXF00000000, JADOFA000000000, JADOEZ000000000, NZ_JADOFE000000000, NZ_JADOFJ000000000, NZ_JADEZG000000000, NZ_JADOFC000000000, NZ_JADEZN000000000, NZ_JADEYX000000000, NZ_JADOFF000000000, NZ_JADEZJ000000000, NZ_JADEYW000000000, NZ_JADEYV000000000, NZ_JADOFH000000000,	99,98–100,00	0,04–2,23	5 090 059–6 036 109	57–57	87–425	4960–6014
2015	44	ST377 (22), ST11 (5), ST395 (4), ST23(5), ST147 (3), ST336 (2), ST48 (2), ST86 (1)	KL102 (20), K2 (4), K57 (4), K64 (3), K15 (2), K23 (2), K24 (2), K25 (2), K62 (2), K1 (1), K27 (1), K39 (1)	JBXPWS010000000, JBXPWQ010000000, JBXPWP010000000, JBXPWO010000000, JBXPWN010000000, JBXPWM010000000, JBXPWK010000000, JBXPWJ010000000 , SAMN63814536, SAMN63814537, SAMN63814538, SAMN63814539, SAMN63814540, SAMN63814541, SAMN63814542, SAMN63814543, SAMN63814544, SAMN63814545, SAMN63814546, SAMN63814547, SAMN63814548, SAMN63814549, SAMN63814550, SAMN63814551, SAMN63814552, SAMN63814553, SAMN63814554, SAMN63814555, SAMN63814556, SAMN63814557, SAMN63814558, SAMN63814559, SAMN63814560, SAMN63814561, SAMN63814562, JBXPWR010000000, NZ_QIUG00000000, NZ_JAFEHN000000000, NZ_JADOFD000000000, JADOFL010000000, JADOFK010000000, NZ_JADEZF000000000, NZ_QIUE00000000	95,73–100,00	0,04–1,21	5 273 795–5 910 925	57–58	56–841	4950–5775

2016	53	ST395 (22), ST147 (10), ST23(6), ST307 (3), ST11 (2), ST377 (2), ST39 (2), ST45 (2), ST313 (1), ST336 (1), ST60 (1), ST86 (1)	K2 (12), K64 (8), K39 (7), K57 (5), KL102 (5), K47 (4), K23 (3), K14 (2), K24 (2), K1 (1), K25 (1), K5 (1), K62 (1), KL166 (1)	JBXPWI010000000, JBXPWG010000000, JBXPWE010000000, JBXPWA010000000, JBXPVY010000000, SAMN63814563, SAMN63814564, SAMN63814565, SAMN63814566, SAMN63814567, SAMN63814568, SAMN63814569, SAMN63814570, SAMN63814571, SAMN63814572, SAMN63814573, SAMN63814574, SAMN63814575, SAMN63814576, SAMN63814577, SAMN63814578, SAMN63814579, SAMN63814580, SAMN63814581, SAMN63814582, SAMN63814583, SAMN63814584, SAMN63814585, SAMN63814586, SAMN63814587, SAMN63814588, SAMN63814589, SAMN63814590, SAMN63814591, SAMN63814592, SAMN63814593, SAMN63814594, SAMN63814596, SAMN63814597, SAMN63814598, SAMN63814595, SAMN63814599, SAMN63814600, SAMN63814601, SAMN63814602, SAMN63814603, NZ_NPJW00000000, NZ_NPIJ00000000, NZ_NPII00000000, NZ_JAFEHO000000000, NZ_JADEZA000000000, NZ_JADEZD000000000	99,91–100,00	0,08–27,33	5 133 803–8 545 079	50–58	74–3 671	4802–10 651
2017	14	ST395 (10), ST147 (2), ST23 (1), ST86 (1)	K2 (5), K39 (5), K1 (1), K10 (1), K64 (1)	SAMN63814606, SAMN63814604, JBXPVX010000000, JBXPVW010000000, JBXPVV010000000, JBXPVU010000000, JBXPVT010000000, SAMN63814605, JBXPVR010000000, JBXPVQ010000000, JBXPVP010000000, JBXPVO010000000, JBXPVN010000000	100,00–100,00	0,07–1,02	5 572 576–5 841 355	57–57	102–305	5193–5685
2018	36	ST395 (14), ST23 (7), ST307 (5), ST14 (1), ST147 (1), ST218 (1), ST219 (1), ST336 (1), ST39 (1), ST4 (1), ST45 (1), ST76 (1), ST86 (1)	K2 (13), K54 (8), KL102 (4), K13 (1), K23 (1), K24 (1), K39 (1), K47 (1), K62 (1), K64 (1), K640 (1), KL107 (1), KL112 (1), KL114 (1)	JBXPVM010000000, JBXPVL010000000, JBXPVK010000000, JBXPVJ010000000, JBXPVI010000000, SAMN63814608, SAMN63814610, SAMN63814615, SAMN63814616, SAMN63814617, JBXPVH010000000, JBXPVF010000000, SAMN63814609, JBXPVE010000000, JBXPVD010000000, SAMN63814611, SAMN63814614, SAMN63814607, SAMN63814613, NZ_JAFFJI000000000, NZ_JAGRZF000000000, NZ_JAGRZJ000000000, NZ_JAGRZI000000000, NZ_JAGRZH000000000, NZ_JAGRZG000000000, NZ_JAGRZE000000000	87,57–100,00	0,07–4,41	4 667 022–5 874 077	56–57	88–1 393	5084–6293
2019	69	ST39 (11), ST395 (7), ST23 (6), ST336 (6), ST219 (5), ST11 (4), ST147 (4), ST15 (4), ST14 (3), ST29 (3), ST48 (3), ST323 (2), ST4023 (2), ST17 (1), ST86 (1), ST268 (1), ST290 (1), ST307 (1), ST423 (1), ST512 (1), ST889 (1), ST1665 (1)	K23 (14), K2 (7), K25 (5), K57 (5), KL114 (5), K64 (4), K21 (3), K27 (3), K30 (3), K48 (3), K62 (3), K13 (2), K39 (2), K1 (1), K8 (1), K16 (1), K19 (1), K20 (1), K38 (1), K47 (1), K54 (1), KL102 (1), KL107 (1)	SAMN63814618, SAMN63814619, SAMN63814620, SAMN63814621, SAMN63814622, SAMN63814625, SAMN63814626, SAMN63814627, SAMN63814624, SAMN63814628, SAMN63814629, SAMN63814630, SAMN63814623, NZ_CP086670, NZ_JAGUTU000000000, NZ_JAGUTT000000000, JAGUTS000000000, NZ_JAGUTR000000000, NZ_JAGUTQ000000000, CP094363, CP086671, NZ_JAFFJK000000000, NZ_JAFFJJ000000000, NZ_JAGVVS000000000, NZ_JAGVVR000000000, NZ_JAGVVQ000000000, JAWDUV010000000, JAWDUU000000000, JAWDUT000000000, JAWDUS000000000, JAWDUR010000000, JAWDUP010000000, JAWDUO010000000, JAWDUN010000000, JAWDUM010000000, JAWDUL010000000, JAWDUK010000000, JAWDUI010000000, JAWDUH010000000, JAWDUG010000000, JAWDUF010000000, JAWDUE010000000, JAWDUB010000000, JAWDUA010000000, JAWDTZ010000000, JAWDTY010000000, JAWDTX010000000 , JAWDTW010000000 , JAWDTT010000000, JAWDTS010000000, JAWDTR010000000, JAWDTQ010000000, JAWDTP010000000, JAWDTO010000000, JAWDTN010000000, JAWDTM010000000	91,27–100,00	0,04–4,09	4 826 445–6 030 145	56–57	89–1 868	5066–6282

Таблица. **Продолжение** / *Table. Continuation*

2020	38	ST395 (12), ST23 (5), ST101 (4), ST336 (4), ST147 (3), ST39 (3), ST307 (2), ST11 (1), ST219 (1), ST231 (1), ST412 (1), ST874 (1)	K2 (7), K57 (6), K39 (5), K17 (4), K25 (4), K23 (3), K64 (3), KL102 (2), K24 (1), K45 (1), K47 (1), K51 (1)	SAMN63814631, SAMN63814632, SAMN63814634, SAMN63814635, SAMN63814636, SAMN63814637, SAMN63814638, SAMN63814639, SAMN63814640, SAMN63814641, SAMN63814642, SAMN63814643, SAMN63814644, SAMN63814645, SAMN63814646, SAMN63814647, SAMN63814648, SAMN63814649, SAMN63814650, SAMN63814651, SAMN63814652, SAMN63814653, SAMN63814654, SAMN63814655, SAMN63814656, SAMN63814657, SAMN63814658, SAMN63814659, SAMN63814660, SAMN63814661, SAMN63814662, SAMN63814663, SAMN63814664, SAMN63814665, SAMN63814633, NZ_JAGUTX000000000	88,01–100,00	0,12–2,06	4 477 623–6 029 701	57–58	85–819	4827–5887
2021	24	ST395 (13), ST101 (2), ST11 (1), ST147 (1), ST15 (1), ST23 (1), ST70 (1), ST86 (1), ST307 (1), ST512 (1), ST874 (1)	K2 (11), K39 (3), K17 (2), K19 (1), K23 (1), K45 (1), K57 (1), K64 (1), KL102 (1), KL107 (1), L136 (1)	SAMN63814666, SAMN63814667, SAMN63814668, SAMN63814669, SAMN63814670, SAMN63814671, SAMN63814672, SAMN63814673, SAMN63814674, SAMN63814675, SAMN63814676, SAMN63814677, SAMN63814678, SAMN63814679, SAMN63814680, SAMN63814681, SAMN63814682, SAMN63814683, SAMN63814684, SAMN63814685, SAMN63814686, SAMN63814687, SAMN63814689, SAMN63814688	100,00–100,00	0,03–0,99	5 407 158–5 987 197	56–57	60–240	5098–5810

метрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, штат Делавэр, США). Полногеномное секвенирование (WGS) изолятов выполняли с использованием набора Nextera DNA Library Preparation Kit и набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (300 циклов) на платформе Illumina MiSeq (Illumina, Inc., Сан-Диего, штат Калифорния, США). Сборку «сырых» прочтений de novo осуществляли с помощью программы Unicycler v0.4.7 [5] со стандартными параметрами. Полноту и уровень контаминации собранных геномов оценивали с помощью инструмента CheckM2 [6]. Аннотацию геномов проводили с использованием веб-ресурса NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [7]. Показано, что качество полученных полногеномных последовательностей удовлетворяет параметрам, необходимым для проведения биоинформатического анализа (таблица).

С использованием разработанного в отделе коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ алгоритма биоинформатического анализа, основанного на применении схемы мультилокусного сиквенс-типирования и KL-типирования базы данных BIGSdb-*Klebsiella* [8], идентифицированы 38 сиквенстипов (ST) и 39 капсульных типов (KL), среди которых наиболее представленными были ST395 (28% изолятов) и KL2 (22% изолятов). При этом выявлены 63 разных комбинации ST/KL, включая наиболее распространенные генетические линии: ST395/KL2 (*n* = 63), ST23/KL57 (*n* = 28), ST147/KL64 (*n* = 26), ST377/KL102 (*n* = 25), ST395/KL39 (*n* = 24) и ST39/KL23 (*n* = 15) (таблица, рисунок).

Показано, что резистом изучаемой популяции изолятов *K. pneumoniae* включает в себя значительное количество (3551) генов, определяющих устойчивость к β-лактамам (1460), в т.ч. карбапенемам (227), к аминогликозидам (725), сульфаниламидам (276), хлорамфениколу (243), триметоприму (224), фторхинолону (210), макролидам (171), тетрациклину (169), блеомицину (41), рифампицину (26), стрептотрицину (4) и эритромицину (2), что согласуется с высоким уровнем представленности MDR- и XDR-фенотипов. Кроме того, в этих геномах выявлена 2031 генетическая детерминанта, ассоциированная с гипервирулентностью *K. pneumoniae* [9, 10]: ген энтеробактина *ent* (99% изолятов), ген аэробактинсинтетазы *iucA* (99% изолятов), кластер генов сальмохелина *iroBCDN* (99%), локус синтеза иерсиниабактина *ybt* (70%), ген регулятора синтеза сидерофоров *irp* (66%), ген рецептора аэробактина *iutA* (62%), гены регуляторов синтеза полисахаридной капсулы *rmpA* (17%) и *rmpA2* (25%), ген пермеазы внутренней мембраны, участвующей в транспорте неизвестных факторов роста в бактериальную клетку, *peg-344* (18%), оперон ABC-транспортера, обеспечивающего поглощение трехвалентного железа, *kfu* (11%), оперон метаболизма аллантоина *all* (3%).

Комплексный анализ геномов изучаемых изолятов *K. pneumoniae* позволяет сделать вывод о гибридной природе большей части (~97%) из них, принадлежности к конвергентным генетическим линиям MDR-hvKp, а также к наиболее эпидемически значимым генетическим линиям CR-hvKp (~76%).

Полученные данные представляют интерес для клиницистов, эпидемиологов и молекулярных биологов с точки зрения оценки современной эпидемиологической ситуации по распространенности генетических линий *K. pneumoniae*, одного из ведущих возбудителей инфекций, связанных с

оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации, понимания структуры резистома и вирулома популяции патогена, что важно для разработки оптимальных диагностических и терапевтических подходов.

Источники финансирования

Работа выполнена в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Funding

The work was carried out at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology using The Unique Research Facility SRCAMB within the framework of an industry research program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Этическая экспертиза

Исследование было проведено на основании решения Этического комитета Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии имени Н.Н.Бурденко (заключение № 11/2018 от 01.11.2018).

Ethical approval

The study was conducted based on a decision by the Ethics Committee of the N.N.Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery (opinion No11/2018 dated November 01, 2018)

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Global antibiotic resistance surveillance report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Geneva: World Health Organization; 2025. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 15.0, 2025 Available at: https://www.eucast.org/bacteria/clinical-breakpoints-and-interpretation (accessed on 02.07.2025).
3. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81. DOI:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
4. Peredo E.L. CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol. 2023. Available at: https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.261gednpdv47/v1 (accessed on 22.09.2026).
5. 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
6. Chklovski A, Parks DH, Woodcroft BJ, Tyson GW. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. Nat Methods. 2023 Aug;20(8):1203-1212. DOI: 10.1038/s41592-023-01940-w
7. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res. 2016 Aug 19;44(14):6614-24. DOI: 10.1093/nar/gkw569
8. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 2018 Sep 24;3:124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
9. Mendes G, Santos ML, Ramalho JF, Duarte A, Caneiras C. Virulence factors in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2023 Nov 30;14:1325077. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1325077
10. Chen H, Liu P, Li X, Liu C, Chen S. Comparative analysis of virulence factors and two-component systems expression in carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates at a tertiary hospital in Wenzhou, China. Microbiol Spectr. 2026 Jul 7;14(7):e0203025. DOI: 10.1128/spectrum.02030-25

Информация о соавторах:

Новикова Татьяна Сергеевна, младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Волков Даниил Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культу ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Доброхотский Олег Олегович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культу ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ершова Ольга Николаевна, доктор медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по эпидемиологической работе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко» Минздрава России
ORCID:0000-0001-9658-807X

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6053-2621

Information about co-authors:

Tatiana S. Novikova, Junior Researcher, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Alexandra E. Solomentseva, Junior Researcher, Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Daniil V. Volkov, Junior Researcher, Culture Collection Department,, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Oleg O. Dobrokhotsky, Junior Researcher, Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Olga N. Ershova, MD, PhD, DSc, Associate Professor, Deputy Chief Physician for Epidemiological Affairs at the Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery
ORCID: 0000-0001-9658-807X

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6053-2621

НОВОСТИ НАУКИ

Новая стратегия применения антибиотиков для борьбы с бактериями группы ESKAPE



Появление мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* обуславливает необходимость разработки новых стратегий борьбы с микроорганизмами. Сообщается о синтезе и оценке синтетических ингибиторов киназы, производных тиазолилбенсульфонамида, направленных на тимидинкиназу (ТК), которая необходима для метаболизма бактериальной ДНК. Производные были синтезированы путем модификации ароматических колец и охарактеризованы методами 1H/13C ЯМР. Соединение DSA3 продемонстрировало значительное взаимодействие с ТК. Тесты на связывание методом флуоресценции подтвердили высокоаффинное связывание DSA3-ТК, что было подтвержде. Исследование методом изотермической титрационной калориметрии выявило экзотермическое самопроизвольное образование комплекса (благоприятные значения ΔG, ΔH, ΔS). Молекулярный докинг показал положение DSA3 внутри АТФ-связывающего кармана ТК, где оно образует водородные связи и гидрофобные контакты с ключевыми остатками, включая каталитический остаток Glu89. Моделирование молекулярной динамики указало на то, что DSA3 стабилизирует структуру ТК, вызывая минимальные конформационные изменения. Важно отметить, что DSA3 эффективно ингибировало АТФазную активность ТК со значением IC50 6,99 мкМ, нарушая ее ферментативную функцию. Тестирование антимикробной активности *in vitro* показало значение МИК (MIC) 50 мкМ, что демонстрирует высокую активность DSA3 против *S. aureus* (ATCC 29213). Эти комплексные результаты подтверждают потенциал DSA3 как перспективного ингибитора ТК, эффективно препятствующего росту бактерий путем воздействия на синтез ДНК. Это подчеркивает потенциал DSA3 в качестве нового терапевтического средства против инфекций, вызванных мультирезистентными штаммами *S. aureus*, предлагая механизм обхода существующих механизмов резистентности.

Hadiya RK, Ashraf A, Wang Y, Khan FI, Khan MA, Renuka L, et al.
Thiazolyl Benzenesulfonamide Derivative as a Novel Inhibitor of Thymidine Kinase:
Promising Therapeutics Against Staphylococcus aureus.
Chem Biodivers. 2025 Nov;22(11):e01600. DOI: 10.1002/cbdv.202501600

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-147-150

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 147–150
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 147–150

Геномные последовательности 125 клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Республике Беларусь в 2016–2025 гг.

А.Е.Соломенцева[1], Е.В.Карпова[2], С.В.Губанов[1], Д.В.Волков[1], А.А.Кисличкина[1], Л.А.Шишкина[1], Н.К.Фурсова[1], Д.В.Тапальский[2], М.В.Фурсов[1]

[1]ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;
[2]ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Представлены результаты полногеномного секвенирования 125 клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в лечебных учреждениях Республики Беларусь в 2016–2025 гг. ДНК секвенировали на платформе DNBSEQ-G99, геномные последовательности собирали *de novo* с помощью Unicycler 0.5.0, качество сборок оценивали с использованием CheckM2. Размеры полученных сборок составили от 5 275 464 до 5 960 572 п.о.; оценочная полнота превышала 98,69%, загрязнение составляло <2,0%. При MLST-типировании выявлено 13 сиквенс-типов; наиболее представлены ST395 (*n* = 50), ST147 (*n* = 23) и ST512 (*n* = 16). Полученный набор геномных последовательностей может использоваться для дальнейших сравнительно-геномных и молекулярно-эпидемиологических исследований
Ключевые слова: Klebsiella pneumoniae, сиквенс, Республика Беларусь

Для цитирования: Соломенцева А.Е., Карпова Е.В., Губанов С.В., Волков Д.В., Кисличкина А.А., Шишкина Л.А., Фурсова Н.К., Тапальский Д.В., Фурсов М.В. Геномные последовательности 125 клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Республике Беларусь в 2016–2025 гг. Бактериология. 2026; 11(3): 147–150. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-147-150

Whole-genome sequences of 125 clinical *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Belarus between 2016 and 2025

A.E.Solomentseva[1], E.V.Karpova[2], S.V.Gubanov[1], D.V.Volkov[1], A.A.Kislichkina[1], L.A.Shishkina[1], N.K.Fursova[1], D.V.Tapalsky[2], M.V.Fursov[1]

[1]State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation;
[2]Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Whole-genome sequencing results are presented for 125 clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from healthcare facilities in the Republic of Belarus between 2016 and 2025. Genomic DNA was sequenced using the DNBSEQ-G99 platform, and genome sequences were assembled *de novo* using Unicycler v0.5.0. Assembly quality was assessed using CheckM2. The resulting genome assemblies were in range from 5 275 464 to 5 960 572 bp, with estimated completeness exceeding 98.69% and contamination levels below 2,0%. Multilocus sequence typing (MLST) identified 12 sequence types, with ST395 (*n* = 50), ST147 (*n* = 23), and ST512 (= 16) being the most prevalent. The resulting collection of genome sequences provides a resource for future comparative genomic and molecular epidemiological studies.
Key words: Klebsiella pneumoniae, sequence, Republic of Belarus

For citation: Solomentseva A.E., Karpova E.V., Gubanov S.V., Volkov D.V., Kislichkina A.A., Shishkina L.A., Fursova N.K., Tapalsky D.V., Fursov M.V. Whole-genome sequences of 125 clinical *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Belarus between 2016 and 2025. Bacteriology. 2026; 11(3): 147–150. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-147-150

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-00

Статья поступила 09.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Aleksandra E. Solomentseva, Juniour Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967)36-00-00

The article was received 09.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

Klebsiella pneumoniae – один из ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, включая инфекции кровотока, дыхательных и мочевыводящих путей. Высокое генетическое разнообразие вида, распространение устойчивых к антимикробным препаратам линий и появление штаммов, сочетающих детерминанты устойчивости и вирулентности, обусловливают необходимость геномного мониторинга [1].

Полногеномное секвенирование позволяет уточнять таксономическую принадлежность изолятов, определять их генетические линии и формировать сопоставимые наборы данных для исследований популяционной структуры и молекулярной эпидемиологии *K. pneumoniae* [2].

В настоящем сообщении представлены геномные последовательности 125 клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в лечебных учреждениях Республики Беларусь в 2016–2025 гг., а также основные показатели качества сборок и результаты MLST-типирования.

Исследуемая выборка включала 125 штаммов *K. pneumoniae*. Материал поступил из 26 лечебных учреждений Республики Беларусь, расположенных в Минске, Гомеле и Гомельской области.

Штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Культуры выращивали при 37°С на питательной среде ГРМ №1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Таблица. **Метаданные клинических штаммов *K. pneumoniae* из Республики Беларусь и характеристики геномных сборок**
Table. ***Metadata of clinical strains of K. pneumoniae from the Republic of Belarus and characteristics of genomic assemblies***

Населенный пункт / регион *City / Region*	Источник выделения *Source of isolation*	Дата выделения *Isolation date*	Код доступа генома в базе данных GenBank *Genome access code in GenBank*	ST (кол-во) *ST (qty)*	Полнота генома, % *Genome completeness, %*	Загрязнение генома, % *Genome contamination, %*	Размер генома, п.о. *Genome size, b.p.*	GC состав, % *GC composition, %*	Кол-во контигов *Number of contigs*
Минск / *Misk*	Абсцесс / *Abscess*	2025	SAMN64160953, SAMN64160981	86 (1), 395 (1)	100	0,25–0,89	5365852–5544393	57,1	40–94
	Кровь / *Blood*	2025	SAMN64160921, SAMN64160923, SAMN64160926, SAMN64160935, SAMN64160936, SAMN64160944, SAMN64160946, SAMN64160947, SAMN64160952, SAMN64160963, SAMN64160964, SAMN64160965, SAMN64160971, SAMN64160972, SAMN64160975, SAMN64160983, SAMN64160986, SAMN64160988, SAMN64160990, SAMN64160991, SAMN64161000	23 (5), 26 (1), 101 (1), 147 (5), 380 (1), 395 (6), 512 (2)	100	0,06–1,48	5429303–5851447	57,1	77–210
	Гной / *Pus*	2025	SAMN64160927	147 (1)	100	1,47	5854335	57,1	105
	Моча / *Urine*	2025	SAMN64160917, SAMN64160924, SAMN64160939, SAMN64160949, SAMN64160954, SAMN64160957, SAMN64160977, SAMN64160978, SAMN64160979, SAMN64160994, SAMN64160996, SAMN64160998	23 (1), 147 (3), 252 (1), 307 (1), 395 (1), 512 (5)	100	0,1–0,92	5275464–5883242	57,1	87–331
	Рана / *Wound*	2025	SAMN64160920, SAMN64160933, SAMN64160934, SAMN64160937, SAMN64160941, SAMN64160958, SAMN64160989, SAMN64160995	147 (3), 395 (2), 512 (3)	100	0,1–1,42	5344457–5960572	57,1	89–145
	Дыхательная система / *Respiratory system*	2025	SAMN64160877, SAMN64160925, SAMN64160928, SAMN64160929, SAMN64160930, SAMN64160931, SAMN64160932, SAMN64160938, SAMN64160942, SAMN64160943, SAMN64160945, SAMN64160948, SAMN64160950, SAMN64160951, SAMN64160955, SAMN64160956, SAMN64160959, SAMN64160961, SAMN64160962, SAMN64160967, SAMN64160970, SAMN64160973, SAMN64160974, SAMN64160976, SAMN64160980, SAMN64160982, SAMN64160984, SAMN64160985, SAMN64160987, SAMN64160992, SAMN64160999	23 (6), 101 (5), 147 (6), 380 (1), 395 (6), 512 (5), 6798 (1), 7120 (1)	98,69-100	0,01–1,48	5354082–5869635	56,0–57,1	86–634
	Другое / *Other*	2025	SAMN64160918, SAMN64160919, SAMN64160922, SAMN64160940, SAMN64160966, SAMN64160968, SAMN64160969, SAMN64160993, SAMN64160997	101 (2), 147 (2), 307 (1), 395 (3), 512 (1)	99,99-100	0,1–1,74	5461911–5873670	57,1	89–193

Гомель / *Gomel*	Кровь / *Blood*	2017	SAMN64160891	395 (1)	100	0,17	5492839	57,1	99
		2018	SAMN64160908	395 (1)	100	0,13	5385502	57,1	146
		2022	SAMN64160883	307 (1)	100	0,09	5442712	57,1	90
	Рана / *Wound*	2016	SAMN64160884	395 (1)	100	0,24	5642565	57,1	145
		2017	SAMN64160886, SAMN64160887, SAMN64160898, SAMN64160900	307 (1), 395 (3)	100	0,14–0,47	5708773–5890562	57,1	125–183
		2018	SAMN64160902, SAMN64160903, SAMN64160904, SAMN64160909, SAMN64160910, SAMN64160911	147 (2), 395 (4)	100	0,17–1,27	5497456–5882527	57,1	115–185
	Дыхательная система / *Respiratory region*	2016	SAMN64160888, SAMN64160889	395 (2)	100	0,46	5882522–5883346	57,1	179–184
		2017	SAMN64160890, SAMN64160892, SAMN64160893	395 (3)	100	0,17–0,46	5498108–5883349	57,1	108–179
		2022	SAMN64160878, SAMN64160879, SAMN64160880, SAMN64160881, SAMN64160882, SAMN64181107	101 (1), 395 (5)	100	0,07–0,32	5283474–5657637	57,1	87–145
	Другое / *Other*	2017	SAMN64160894, SAMN64160901	147 (1), 395 (1)	100	0,17–1,43	5498253–5782009	57,1	114–125
Гомельская область / *Gomel region*	Моча / *Urine*	2016	SAMN64160885	395 (1)	100	0,46	5882977	57,1	176
		2017	SAMN64160897	11 (1)	100	0,09	5702835	57,1	125
		2018	SAMN64160914	147 (1)	100	1,43	5771855	57,1	130
	Рана / *Wound*	2018	SAMN64160907, SAMN64160912	395 (2)	100	0,19–0,39	5660868–5739046	57,1	157–158
	Гной / *Pus*	2017	SAMN64160895	395 (1)	100	0,46	5887172	57,1	176
	Дыхательная система / *Respiratory system*	2017	SAMN64160896, SAMN64160899	395 (2)	100	0,46	5881384–5883360	57,1	172–182
		2018	SAMN64160905, SAMN64160906, SAMN64160913, SAMN64160915, SAMN64160916	23 (1), 147 (1), 395 (3)	100	0,16–0,47	5450999–5833428	57,1	146–185

Геномную ДНК выделяли методом с использованием цетилтриметиламмонийбромида. После фрагментации ДНК на системе Bioruptor (Diagenode) библиотеки подготавливали с применением набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech). Секвенирование проводили на платформе DNBSEQ-G99 с использованием набора DNBSEQ-G99RS High-throughput Sequencing Reagent Set (MGI Tech). Полученные прочтения собирали *de novo* с помощью Unicycler v0.5.0. Качество сборок оценивали программой CheckM2; MLST-типирование выполняли с использованием схемы BIGSdb/PubMLST.

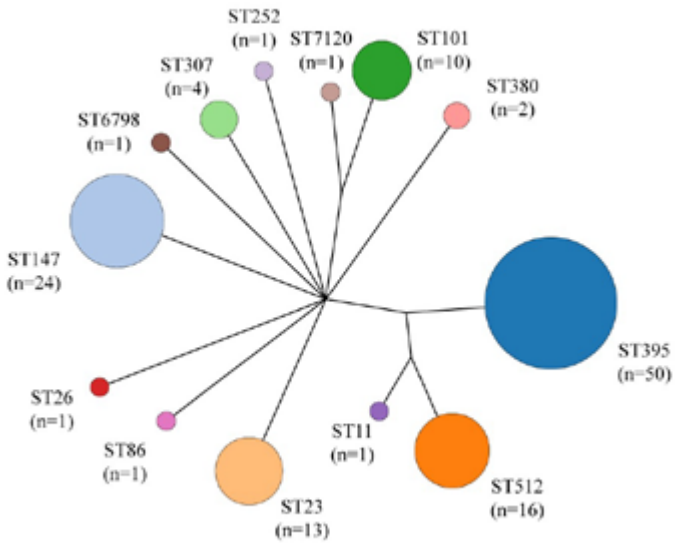


Рисунок. **Схематическое представление распределения штаммов *K. pneumoniae* по сиквенс-типам (MLST). Размер круга отражает число штаммов соответствующего ST.**
Figure. ***A schematic representation of the distribution of K. pneumoniae strains by sequence types (MLST). The size of the circle reflects the number of strains of the corresponding ST.***

Длины геномных сборок составили от 5 275 464 до 5 960 572 п.о. По результатам CheckM2 оценочная полнота сборок превышала 98,69%, а оценочное загрязнение было <2,0%, GC-состав находился в пределах 0,56–0,57. Среди 124 штаммов выявлено 13 сиквенс-типов; наиболее распространены ST395, ST147 и ST512 (рисунок). Подробная информация об образцах и геномах представлена в таблице.

Полученные геномные последовательности формируют основу для последующего сравнительного анализа клинических штаммов *K. pneumoniae*, включая определение генетических детерминант устойчивости к антимикробным препаратам, факторов вирулентности и капсульных локусов.

Представленный набор данных может быть использован для сопоставления генетического разнообразия клинических популяций *K. pneumoniae* в Республике Беларусь и других регионах.

Источники финансирования

Работа выполнена в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной

научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Funding

The work was carried out at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology using The Unique Research Facility SRCAMB within the framework of an industry research program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Этическая экспертиза

Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (протокол № 2 от 28.01.2026).

Ethical approval

The study protocol was approved by the Bioethics Commission of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (protocol No 2 dated January 28, 2026).

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Nagendra D, Suresh V, Udupa AA, Srinivas T, Eshwara VK, Varma M, et al. Definitional ambiguity and the dual threat of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infections: a systematic review and meta-analysis. Infection. 2026 Apr;54(2):645-681. DOI: 10.1007/s15010-025-02708-4
2. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18:344-59. DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1

Информация о соавторах:

Карпова Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая Центром медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»
ORCID: 0000-0002-3952-6187

Губанов Сергей Вячеславович, младший 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
ORCID: 0000-0001-8389-2494

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

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6053-2621

Тапальский Дмитрий Викторович, доктор медицинских наук, профессор, директор ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»
ORCID: 0000-0002-9484-7848

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-9137-9551

Information about co-authors:

Elena V. Karpova, PhD, MD, Associate Professor, Head of the Center for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus
ORCID: 0000-0002-3952-6187

Sergey V. Gubanov, Junior Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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

Angelina A. Kislichkina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-8389-2494

Lidiya A. Shishkina, PhD in Biological Sciences, Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6053-2621

Dmitry V. Tapalsky, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus
ORCID: 0000-0002-9484-7848

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Culture Collections Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-9137-9551

DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-151-153

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 151–153
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 151–153

Скрининг спорообразующих бактерий, активных против антимикотикорезистентных грибов рода *Candida*

И.А.Дунайцев, С.К.Жиглецова, М.В.Клыкова, Т.А.Калмантаев, П.В.Слукин, Н.К.Фурсова

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

Из образцов почв, собранных в различных регионах и климатических зонах России, выделено 86 спорообразующих изолятов бактерий, из которых 27 обладали антагонистической активностью в отношении кишечных патогенов. Из них 10 культур продемонстрировали антагонистическую активность против грибов рода *Candida*, выделенных из биоматериалов онкобольных и устойчивых к амфотерицину, флуконазолу или циклопироксу. Четыре наиболее активных штамма – *Peribacillus simplex* Lhv-151, *Bacillus subtilis* ИПМ-215, *Bacillus megaterium* Kav-281 и R-110 – не обладали гемолитической активностью и могут рассматриваться в качестве продуцентов пробиотических препаратов против кандидемии.

Ключевые слова: спорообразующие микроорганизмы, кандидемия, антибиотикорезистентность, пробиотические препараты

Для цитирования: Дунайцев И.А., Жиглецова С.К., Клыкова М.В., Калмантаев Т.А., Слукин П.В., Фурсова Н.К. Скрининг спорообразующих бактерий, активных против антимикотикорезистентных грибов рода *Candida*. Бактериология. 2026; 11(3): 151–153. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-151-153

Screening for spore-forming bacteria active against antibiotic-resistant fungi of the genus *Candida*

I.A.Dunaytsev, S.K.Zhigletsova, M.V.Klykova, T.A.Kalmantaev, P.V.Slukin, N.K.Fursova

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

86 spore-forming bacterial isolates were isolated from soil samples collected in various regions and climatic zones, 27 of which exhibited antagonistic activity against intestinal pathogens. Of these, 10 cultures demonstrated antagonistic activity against *Candida* species isolated from cancer patient biomaterials and resistant to amphotericin, fluconazole, or ciclopirox. The four most active strains – *Peribacillus simplex* Lhv-151, *Bacillus subtilis* IPM-215, *Bacillus megaterium* Kav-281, and R-110 – lacked hemolytic activity and could be considered as potential producers of probiotic preparations against candidemia.

Key words: spore-forming microorganisms, candidemia, antibiotic resistance, probiotic preparations

For citation: Dunaytsev I.A., Zhigletsova S.K., Klykova M.V., Kalmantaev T.A., Slukin P.V., Fursova N.K. Screening for spore-forming bacteria active against antibiotic-resistant fungi of the genus *Candida*. Bacteriology. 2026; 11(3): 151–153. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-151-153

Инвазивные микозы продолжают оставаться опасными заболеваниями, и распространенность их не снижается. Частыми возбудителями глубоких микозов являются грибы рода *Candida*. Особенно опасна кандидемия у онкологических больных и других пациентов с иммунодефицитом [1–3]. Высокая смертность от кандидемии обусловлена в основном неточностью диагностики и резистентностью патогенов к применяемым антимикробным препаратам [3, 4]. Поэтому разработка и внедрение препаратов на основе антагонистов антимикотикорезистентных грибов рода Candida позволили бы уменьшить частоту использования антимикотических препаратов или даже исключить их применение [5, 6]. Использование в качестве действующего начала пробиотических препаратов микроорганизмов, обра-

Для корреспонденции:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: 8-4967-360000
E-mail: dunaytsev@obolensk.org
ORCID: 0000-0003-0768-5295

Статья поступила 03.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Igor A. Dunaytsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher at the Department of Biotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: 8-4967-360000
E-mail: dunaytsev@obolensk.org
ORCID: 0000-0003-0768-5295

The article was received 03.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

зующих споры, может способствовать лучшей выживаемости таких культур в желудочно-кишечном тракте и, следовательно, их большей эффективности [5, 6].

Цель работы – выделение и отбор спорообразующих бактерий, эффективных против антимикотикорезистентных грибов рода *Candida*, для лечения кандидемии.

Для выделения антимикотикорезистентных штаммов грибов рода *Candida* посевы крови выдерживали в геманализаторе-инкубаторе BD BACTEC FX 400 (Becton Dickinson, США) в течение 5 суток и в автоматическом бактериологическом анализаторе Bact/ALERT 3D (BioMerieux, Франция) в течение 7 суток. Идентификацию микроорганизмов проводили на приборе MALDI-TOF Microflex LT (Biotyper, Bruker Daltonics, Германия).

Минимальную подавляющую концентрацию амфотерицина, флуконазола, и циклопирокса определяли методом микроразведений в бульоне в 96-луночных культуральных планшетах по МУК 4.2.1890–04.

Спорообразующие микроорганизмы выделяли из почвенных проб массой 1–2 г. Образцы проб переносили в колбы с 50 мл ГРМ-бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Колбы инкубировали 24 ч при 160 об./мин и 28 ± 1°С. Выращенную культуральную жидкость рассевали истощающим штрихом на ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Для выросших единичных колоний микроорганизмов определяли антагонистическую активность в отношении кишечных патогенов и антимикотикорезистентных кандид.

На основе ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков. Раздел 3» изучали антагонистическую активность выделенных спорообразующих изолятов. В качестве тест-культур использовали следующие штаммы патогенных и условно-патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli* O157 MPA II3, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (FDA 209P), *Shigella flexneri* 170, *Shigella sonnei* 5063, *Proteus mirabilis* 3177, *Proteus vulgaris* 177, *Candida albicans* ATCC 10231. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Антибиотикорезистентные штаммы грибов рода Candida были выделены из биоматериалов пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

Гемолитическую активность выделенных спорообразующих штаммов исследовали на среде «Колумбийский агар сухой» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) с добавлением 5% стерильной бараньей дефибринированной крови. Суточные культуры наносили штрихом на поверхность кровяного агара и инкубировали при 37°С в течение 48 ч.

Из выделенных штаммов *C. albicans* два были устойчивы к амфотерицину, два – к флуконазолу. Из выделенных штаммов *Candida parapsilosis* три также были устойчивы к флуконазолу и один – к циклопироксу. По одному штамму *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* и *Candida tropcalis* были устойчивы к флуконазолу, один штамм *Candida inconspicua* был устойчив к циклопироксу.

Из образцов почв, собранных в различных регионах и климатических зонах России, было выделено 86 спорообразующих изолятов. Для выделенных культур исследована способность подавлять стандартные кишечные патогены. Антагонистической активностью обладали 27 выделенных штаммов.

Для штаммов, продемонстрировавших наиболее высокую активность, была исследована способность к подавлению антибиотикорезистентных кандид. Штаммы Krl-188, Lhv-171, Lhv-151, ИПМ-215, R-110a, а также изоляты 13а, 17в, 19б, и 20б полностью подавляли рост штаммов *C. albicans*, устойчивых к амфотерицину и флуконазолу, *C. parapsilosis*, устойчивых к флуконазолу и циклопироксу, а также *C. lusitaniae* и *C. tropcalis*, устойчивых к флуконазолу.

Для штаммов, продемонстрировавших наибольшую антагонистическую активность против нескольких патогенов, были определены гемолитические свойства. Гемолитической активностью не обладали 4 штамма: *Peribacillus simplex* Lhv-151, *Bacillus subtilis* ИПМ-215, *Bacillus megaterium* Kav-281 и R-110. 14 штаммов показали высокую гемолитическую активностью (β-гемолиз), два штамма вызывали еще и α-гемолиз. Штаммы, не обладающие гемолитической акивностью, могут быть отобраны в качестве перспективных продуцентов пробиотических препаратов.

Проведенные исследования показали перспективность скрининга почвенных спорогенных микроорганизмов для создания пробиотических препаратов на их основе. В качестве эффективных продуцентов препаратов против кандидемии могут быть отобраны следующие штаммы: *P. simplex* Lhv-151, *B. subtilis* ИПМ-215, *B. megaterium* Kav-281 и *B. megaterium* R-110.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой научной программы Роспотребнадзора в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН ГНЦ ПМБ.

Funding

The work was carried out within the framework of the industry scientific program of Rospotrebnadzor at the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology on a unique scientific facility of the Federal Budgetary Institution of Science State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение

и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. McCarthy MW, Walsh TJ. Candidemia in the cancer patient: diagnosis, treatment, and future directions. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018 Nov;16(11):849-854. DOI: 10.1080/14787210.2018.1536546
2. Colombo AL, Agnelli C, Kontoyiannis DP. Knowledge gaps in candidaemia/invasive candidiasis in haematological cancer patients. J Antimicrob Chemother. 2021 Feb 11;76(3):543-546. DOI: 10.1093/jac/dkaa446
3. Багирова НС, Горемыкина ЕА, Слукин ПВ, Хохлова ОЕ, Фурсова НК, Петухова ИН, и др. Кандидемия у онкологических больных: фенотипические и молекулярно-генетические характеристики резистентности к противогрибковым лекарственным средствам, гены факторов патогенности *Candida* spp. Сибирский онкологический журнал. 2022;21(3):70-80. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-3-70-80
4. Togano T, Suzuki Y, Nakamura F, Tse W, Kume H. Epidemiology of visceral mycoses in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome: Analyzing the national autopsy database in Japan. Med Mycol. 2021 Jan 4;59(1):50-57. DOI: 10.1093/mmy/myaa029
5. Popov IV, Algburi A, Prazdnova EV, Mazanko MS, Elisashvili V, Bren AB, et al. A Review of the Effects and Production of Spore-Forming Probiotics for Poultry. Animals (Basel). 2021 Jun 29;11(7):1941. DOI: 10.3390/ani11071941
6. Похиленко ВД, Перелыгин ВВ. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. Химическая и биологическая безопасность. 2007;2-3(32-33):20-41.

References

1. McCarthy MW, Walsh TJ. Candidemia in the cancer patient: diagnosis, treatment, and future directions. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018 Nov;16(11):849-854. DOI: 10.1080/14787210.2018.1536546
2. Colombo AL, Agnelli C, Kontoyiannis DP. Knowledge gaps in candidaemia/invasive candidiasis in haematological cancer patients. J Antimicrob Chemother. 2021 Feb 11;76(3):543-546. DOI: 10.1093/jac/dkaa446
3. Bagirova NS, Goremykina EA, Slukin PV, Khokhlova OE, Fursova NK, Petukhova IN, et al. Candidemia in cancer patients: phenotypical and molecular-genetic characteristics of antifungal drug resistance, pathogenic factor genes of *Candida* spp. Siberian Journal of Oncology. 2022;21(3):70-80. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-3-70-80 (In Russian).
4. Togano T, Suzuki Y, Nakamura F, Tse W, Kume H. Epidemiology of visceral mycoses in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome: Analyzing the national autopsy database in Japan. Med Mycol. 2021 Jan 4;59(1):50-57. DOI: 10.1093/mmy/myaa029
5. Popov IV, Algburi A, Prazdnova EV, Mazanko MS, Elisashvili V, Bren AB, et al. A Review of the Effects and Production of Spore-Forming Probiotics for Poultry. Animals (Basel). 2021 Jun 29;11(7):1941. DOI: 10.3390/ani11071941
6. Pokhilenko VD, Perelygin VV. Probiotics on the basis of spore-forming bacteria and their safety. Chemical and biological safety. 2007;2-3(32-33):20-41. (In Russian).

Информация о соавторах:

Жиглецова Светлана Константиновна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-2790-9447

Клыкова Марина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Калмантаев Тимур Ахмерович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Слукин Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-4976-0145

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6053-2621

Information about co-authors:

Svetlana K. Zhigletsova, PhD in Chemical Sciences, Leading Researcher at the Department of Biotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-2790-9447

Marina V. Klykova, PhD in Biological Sciences, Researcher at the Department of Biotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Timur A. Kalmantaev, PhD in Biological Sciences, Researcher at the Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Pavel V. Slukin, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Antimicrobial Agents, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-4976-0145

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Antimicrobial Agents, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6053-2621

Правила оформления статей
(основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ И. И. Иванов*, П. П. Петров** *Первая организация, г. Москва, РФ **Вторая организация, Техас, США E-mail [далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (http://www.nlm.nih.gov/).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:
142279, Московская обл.,
Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ
Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10
E-mail: info@obolensk.org
или
bacteriology@obolensk.org