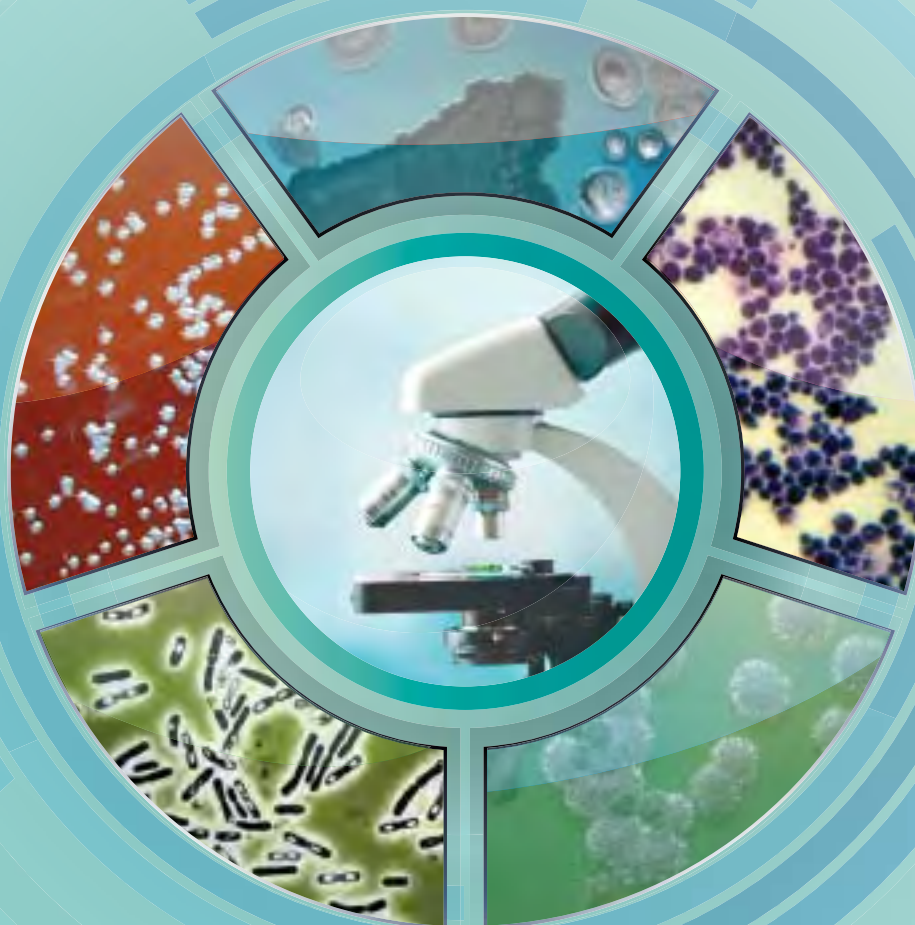


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2019 • ТОМ 4 • №1

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, член-корр. 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 (Китай)

Редколлегия

Адъяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)	И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)	В.Л.Мотин, проф. (США)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	А.Ракин (Германия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
М.Косой, к.б.н. (США)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)

Учредитель

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

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
Серпуховский район, п. Оболенск
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

Подписано в печать 27.03.2019 г.

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 1000 экз. Цена свободная.

Отдел рекламы:
Телефон: +7 495 517-7055

Подписной индекс по объединенному
каталогу «Пресса России»: 39920

Колонка главного редактора

Средства специфической профилактики опасных бактериальных инфекций и разработка новых вакцин 5

Оценка эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами
А.И.Марченко, Г.А.Жариков, О.А.Крайнова, В.П.Дядищева, Л.В.Челпых 8

Микробный пейзаж при гнойно-септических заболеваниях и антибиотикорезистентность выделенных микроорганизмов
Ю.Н.Захарьевская 17

Оценка эффективности использования УФ-облучателей рециркуляторного типа для обеззараживания воздушной среды в закрытых помещениях
А.В.Загайнова, М.А.Сухина, Т.З.Артемова, Е.К.Гипп, И.В.Курбатова, Т.Н.Максимкина, Н.В.Русаков, С.А.Фролов, В.Н.Кашников, Д.А.Чистякова 21

Обучение регламентированным методам лабораторной диагностики холеры с использованием набора учебных штаммов
Е.В.Растунцева, Л.А.Тихомирова, Ю.А.Попов 28

Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, В.П.Мякина, В.М.Красильникова, В.В.Верёвкин, Н.В.Воложанцев 34

Использование веб-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» для изучения генома STEC штамма *E. coli* серотипа O101:H33
Н.Н.Карцев, Ю.П.Скрябин, А.А.Кисличкина, А.Г.Богун, М.Е.Канашенко, Н.К.Фурсова, Э.А.Светоч 44

Междолевая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака
Е.А.Меньшикова, Е.М.Курбатова, С.О.Водопьянов, С.В.Титова, А.В.Миронова 50

Испытания рабочей и защитной одежды из современных материалов для использования в бактериологических лабораториях
Л.В.Чекан, Е.А.Тюрин 54

Elizabethkingia meningoseptica как значимый клинический патоген
М.Е.Канашенко, Н.Н.Карцев, И.П.Мицевич, М.В.Храмов, Э.А.Светоч 58

45 лет ГНЦ ПМБ

Как все начиналось. Воспоминания ветерана
Н.В.Поправко 64

История развития одного научного направления
В.Д.Бунин 68

Правила для авторов 74

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, Sc.D.
(Russia)

Editorial Council

A.P.Anisimov, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Balakhonov, Sc.D., prof. (Russia)
A.N.Kulichenko, corr. member 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 (China)

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviimyadagiin, PhD (Mongolia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)
V.A.Davidyants, Sc.D., prof. (Armenia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)
G.A.Karimova, PhD (France)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (England)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)

Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)
I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.L.Motin, prof. (USA)
A.Rakin (Germany)
K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.P.Shepelin, Sc.D. (Russia)
E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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: +7 495 517 7055; e-mail: reklama@mm-agency.ru

Editor-in-Chief's Introduction

Specific prevention of dangerous bacterial infections and the development of new vaccines	5
Evaluation of the diesel-contaminated sod-podzolic soil bioremediation efficiency by microorganism-destroyers immobilized on microcapsules <i>A.I.Marchenko, G.A.Zharikov, O.A.Krainova, V.P.Dyadisheva, L.V.Chelpykh</i>	8
Microbial landscape of festering-septic diseases and antibiotic resistance of the selected strains <i>Yu.N.Zakharyevskaya</i>	17
Evaluation of the effectiveness of the use of recycle-type UV irradiators for disinfecting the air environment in enclosed spaces <i>A.V.Zagainova, M.A.Sukhina, T.Z.Artemova, E.K.Gipp, I.V.Kurbatova, T.N.Maksimkina, N.V.Rusakov, S.A.Frolov, V.N.Kashnikov, D.A.Chistyakova</i>	21
Training in regimented methods of laboratory cholera diagnostics using the panel of practice educational strains <i>E.V.Rastuntseva, L.A.Tikhomirova, Yu.A.Popov</i>	28
Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice <i>A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, V.P.Myakinina, V.M.Krasilnikova, V.V.Verevkin, N.V.Volozhantsev</i>	34
Use of the web-resource «Center for Genomic Epidemiology» for study of the STEC strain genome <i>Escherichia coli</i> <i>N.N.Kartsev, Yu.P.Skryabin, A.A.Kislichkina, A.G.Bogun, M.E.Kanashenko, N.K.Fursova, E.A.Svetoch</i>	44
Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of <i>Vibrio cholerae</i> and autokhtonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish <i>E.A.Menshikova, E.M.Kurbatova, S.O.Vodopyanov, S.V.Titova, A.V.Mironova</i>	50
Testing of working and protective clothes from modern materials for use in bacteriological laboratories <i>L.V.Chekan, E.A.Tyurin</i>	54
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i> as a significant clinical pathogene <i>M.E.Kanashenko, N.N.Kartsev, I.P.Mitsevich, M.V.Khramov, E.A.Svetoch</i>	58

45th anniversary of SRCAMB

How it all began. Veteran memories <i>N.V.Popravko</i>	64
History of one scientific direction development <i>V.D.Bunin</i>	68
Instructions for Authors	74

Средства специфической профилактики опасных бактериальных инфекций и разработка новых вакцин

Кommerческие вакцины для создания иммунитета у людей против таких инфекций, как чума, сибирская язва, туляремия и бруцеллез, созданы несколько десятилетий назад и выпускаются в основном по устаревшим технологиям. Для заболеваний, вызванных шигатоксинпродуцирующими эшерихиями, зарегистрированных вакцин в мире нет. Живые вакцины против бактериальных инфекций в мире, кроме России и некоторых стран СНГ, практически никто не использует в силу их высокой реактогенности и опасности реверсии (как считают некоторые западные ученые) в вирулентное состояние. Вакцины против бактерий I–II групп патогенности (по национальной классификации) сыграли большую роль в профилактике этих инфекций в разные периоды жизни страны, обеспечив существенное снижение заболеваемости и смертности населения.



Эпидемиологическая обстановка в мире и России по этим инфекциям остается напряженной. Так, проявления чумы регистрировались в 2014, 2015, 2016 гг. по одному случаю заболеваний человека в Горном Алтае. Всего в России 11 природных очагов, включая трансграничные со странами Средней Азии, Монголией и Китаем, где циркулируют наиболее опасные штаммы этого возбудителя. Продолжается интенсивная вспышка чумы на Мадагаскаре. В России регистрируется от 10 до 25 случаев заболеваний человека в год сибирской язвой, в 2016 г. наблюдался массовый падеж оленей в Ямало-Ненецком АО и заболевания людей. Существуют спорадические случаи заражения людей туляремией в многочисленных природных очагах; в 2013 г. зарегистрирована вспышка в Ханты-Мансийске – более 2500 заболевших. В России наблюдается более 400 случаев выявления заболеваний бруцеллезом у людей в южных регионах европейской и азиатской части страны в год. Вспышки эшерихиозов со смертельными исходами, вызванные штаммом *E. coli* O104:H4 наблюдались в Грузии в 2009 г. и в Германии в 2011 г. В 2018 г., подростки из России, побывавшие в Грузии, заболели кишечной инфекцией, вызванной сходным штаммом с развитием гемолитико-уремического синдрома. Постоянно регистрируются заболевания людей, вызванные штаммом *E. coli* O157:H7 и другими серовариантами, несущими шигатоксины первого и второго типов.

Кроме природных источников заражения данными возбудителями, следует учитывать, что эти патогены являются потенциальными элементами бактериологического оружия или инструментами биотерроризма. Выявляемые современные штаммы несут различные гены устойчивости к антибактериальным препаратам, что делает их особенно опасными в отношении эффективности лечения. Одним из направлений борьбы с антибиотикорезистентностью бактерий является специфическая иммунопрофилактика с использованием живых или рекомбинантных химических вакцин.

Наиболее эффективная, используемая в России вакцина чумная живая сухая (*Vaccinum pestosum vivum siccum*) выпускается по устаревшим технологиям, а производственные линии нуждаются в существенной реконструкции. В США ранее выпускалась вакцина USP из вирулентного штамма 195/P, убитого формальдегидом, но она была малоэффективной. В военной лаборатории Портон Даун (Англия) разрабатывается субъединичная вакцина из рекомбинантных антигенов *Y. pestis* – F1 и LcrV. В Форт Детрике (США) проводят испытания слитного белка F1-LcrV (F1-LcrV fusion protein). В 2018 г. в ГНЦ ПМБ разработана, запатентована и зарегистрирована субъединичная микроинкапсулированная вакцина на основе рекомбинантных V-антигена и капсульного антигена, которая может быть использована для ревакцинации у лиц с известным уровнем напряжен-



ности противочумного иммунитета. Однако повышение эффективности и безопасности чумных вакцин остается актуальной задачей, которая может быть решена в ближайшее время на основе использования новых сведений о структуре и патогенезе возбудителя с использованием генноинженерных подходов.

Живые туляремиальные вакцины созданы на основе штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ – в России и *F. tularensis* LVS – за рубежом. Технология

коммерческой вакцины туляремиальной живой давно нуждается в коренном пересмотре и создании современного производства. Генетические методы направленной модификации генома *F. tularensis*, созданные в ГНЦ ПМБ, открыли новые возможности для создания более совершенных вакцин. В России и зарубежных странах создана целая серия потенциальных вакцинных штаммов, которые показали хорошие результаты на экспериментальных моделях. В ГНЦ ПМБ создан новый кандидатный в вакцинные штамм, лишенный гена *recA*, одной копии гена *iglC* и содержащий модифицированный ген *sodB* с пониженной трансляционной активностью, что открывает перспективы для получения более безопасной и эффективной живой вакцины. В ГНЦ ПМБ созданы все молекулярно-генетические инструменты для редактирования генома туляремиального микроба с целью создания новых живых и субъединичных вакцин нового поколения.

Сибиреязвенные вакцины в настоящее время чрезвычайно востребованы из-за постоянного проявления данного заболевания у людей и животных. В России используется живая вакцина СТИ-1, а также зарегистрирована вакцина СТИ-1 с добавлением протективного антигена. Необходимо создать современную технологию для выпуска данной вакцины и внедрения ее рекомбинантного варианта. В России, в РосНИПЧИ «Микроб», разработаны прототипы эффективной вакцины на основе рекомбинантного протективного антигена возбудителя и белка EA1, полученные из аспорогенного рекомбинантного продуцента и очищенные с использованием двухэтапной хроматографии. Работы в этом перспективном направлении могут привести к созданию отечественной рекомбинантной вакцины для ревакцинации людей и первичной иммунизации против сибирской язвы.

Для иммунопрофилактики бруцеллеза у людей, с целью защиты от заражения бруцеллами козье-овечьего вида (*Brucella melitensis*), в России используется живая вакцина на основе штамма *B. abortus* 19ВА. Вакцина обладает множеством побочных эффектов, не позволяющих считать ее соответствующей современным требованиям. Разработки новых бруцеллезных вакцин в мире ведутся с малой интенсивностью, хотя уже получены рекомбинантные иммунодоминантные антигены, которые могут быть использованы как компоненты новых субъединичных химических вакцин. В Китае для создания новых вакцин используются наиболее иммуногенные белки Omp31 и Omp22, играющие также роль в вирулентности, и их предшественники, в частности, регуляторный железосодержащий белок FrpB. Создан полимерный антиген BLSOmp31, на основе которого разработана кандидатная вакцина BLSOMP31-AX. Разработаны новые живые вакцины на основе рекомбинантного штамма *B. melitensis* M5-90 manB мутант (M5-90ΔmanB), который во многом



устраняет отрицательные эффекты существующих вакцин. Также разрабатывается вакцина на основе *B. abortus* 2308 Δ NodV Δ NodW с нокаутными генами на основе вирулентного штамма *B. abortus* 2308 (S2308).

Предпринимаются попытки разработки эффективных ДНК-вакцин на основе генов протективных антигенов. Однако это перспективное направление пока сдерживается из-за нерешенных вопросов безопасности их применения, особенно в отдаленный период после применения.

В мире предпринимались многочисленные попытки разработки эффективных эшерихиозных вакцин, которые до настоящего времени не показали хороших результатов. Значимость эшерихиозов в инфекционной патологии будет с каждым годом нарастать, учитывая, что кишечная палочка является постоянным обитателем кишечника человека и горизонтальная передача факторов вирулентности между различными серовариантами весьма вероятна. В ГНЦ ПМБ, совместно с профильным производителем вакцин для кишечных инфекций – ООО «Гритвак», разработан прототип конъюгированной полисахаридной вакцины в сочетании с рекомбинантными иммунодоминантными антигенами для профилактики шигатоксинпродуцирующих эшерихиозов, вызванных штаммами *E. coli* O157:H7 и O104:H4, показавшими в модельных экспериментах на животных достаточно высокую эффективность. Внутрибрюшинная иммунизация мышей моно- и комбинированными неэндотоксичными препаратами ЛПС из этих штаммов индуцирует образование высоких титров специфических IgG и эффективную защиту от внутрибрюшинного заражения смертельными дозами гомологичных штаммов. Наибольший протективный эффект наблюдался при применении комбинированного препарата – модифицированного ЛПС из *E. coli* O157:H7 и 104:H4.

Учитывая большие потоки миграции населения, наличие природных очагов инфекций, появление штаммов с высокой лекарственной устойчивостью и повышенной вирулентностью, разработки в области создания и организации производства вакцин на современном уровне против наиболее опасных и высококонтагиозных бактериальных патогенов являются одной из наиболее приоритетных задач медицинской микробиологии.

И.А.Дятлов

*Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор*

Оценка эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами

А.И.Марченко, Г.А.Жариков, О.А.Крайнова, В.П.Дядищева, Л.В.Челпых

ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация

В лабораторных исследованиях изучена эффективность биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, микрокапсулированными и некапсулированными углеводородокисляющими микроорганизмами-деструкторами.

Показано, что присутствие дизельного топлива в дерново-подзолистой почве негативно влияло на ее биологическую активность. Углеводородокисляющие микроорганизмы, внесенные в почву, разлагали нефтепродукты до допустимых значений. В микрокапсулированной форме микроорганизмы размножались в 1,5–2 раза лучше, чем в некапсулированной.

В ходе микробной биоремедиации возрастала численность интродуцированных бактерий-деструкторов и сапрофитной микрофлоры, снижались концентрация углеводородов и интегральная токсичность почвы, улучшалась ее биологическая активность. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование для биоремедиации почв, загрязненных дизельным топливом, микроорганизмы-деструкторы, иммобилизованные на микрокапсулах из полимочевины.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы углеводородов, иммобилизация клеток, биodeградация, дизельное топливо, биоремедиация, биологическая активность почвы

Для цитирования: Марченко А.И., Жариков Г.А., Крайнова О.А., Дядищева В.П., Челпых Л.В. Оценка эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами. Бактериология. 2019; 4(1): 8–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-8-16

Evaluation of the diesel-contaminated sod-podzolic soil bioremediation efficiency by microorganism-destroyers immobilized on microcapsules

A.I.Marchenko, G.A.Zharikov, O.A.Krainova, V.P.Dyadisheva, L.V.Chelpykh

National Research Centre «Institute of Immunology» of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

The effectiveness of bioremediation of diesel contaminated sod-podzolic soil by microencapsulated and non-encapsulated hydrocarbon-oxidizing microorganisms-destroyers has been studied in model laboratory studies.

It was shown that the presence of diesel fuel in sod-podzolic soil adversely affected its biological activity. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms introduced into the soil, decomposed oil products to acceptable values. In the microencapsulated form, microorganisms multiplied 1.5 to 2 times better than in the non-encapsulated.

In the course of microbial bioremediation, the number of introduced bacteria-destroyers and saprophytic microflora increased, the concentration of hydrocarbons and the integral toxicity of the soil decreased, and its biological activity improved.

This results allow us to recommend the use of native microorganisms-destroyers immobilized on polyurea microcapsules for the bioremediation of soils contaminated with diesel fuel.

Keywords: hydrocarbon microorganisms-degraders, cell immobilization, diesel fuel, bioremediation

For citation: Marchenko A.I., Zharikov G.A., Krainova O.A., Dyadisheva V.P., Chelpykh L.V. Evaluation of the diesel-contaminated sod-podzolic soil bioremediation efficiency by microorganism-destroyers immobilized on microcapsules. Bacteriology. 2019; 4(1): 8–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-8-16

Для корреспонденции:

Марченко Анатолий Иванович, кандидат биологических наук, начальник лаборатории изучения токсичности *in vitro* отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиала ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А

Телефон: (4967) 705-238

E-mail: marchenko@toxicbio.ru

Статья поступила 20.01.2019 г., принята к печати 27.03.2019 г.

For correspondence:

Anatoliy I. Marchenko, PhD (Biol.), Head of the Laboratory for In Vitro Toxicity Studies in the Ecological Biotechnology Department at Research center for toxicology and hygienic regulation of biopreparations – affiliated institution at National Research Centre «Institute of Immunology» of the Federal Medical-Biological Agency of Russia

Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation

Phone: (4967) 705-238

E-mail: marchenko@toxicbio.ru

The article was received 20.01.2019, accepted for publication 27.03.2019

Нефть и нефтепродукты являются ключевыми загрязнителями биосферы, одним из важнейших компонентов которой является почва [1, 2]. При этом резко снижаются плодородие почв и качество получаемой продукции [3, 4]. Загрязненная углеводородами нефти почва оказывает существенное влияние на здоровье населения и имеет гигиеническое значение [5], так как формирует химический состав потребляемых человеком продуктов питания животного и растительного происхождения, а также питьевой воды. В аграрном секторе особая роль принадлежит дизельному топливу, которое чаще всего применяется в сельскохозяйственной технике.

В естественных условиях нефтепродукты подвергаются деградации аборигенной микрофлорой почвы. При этом процесс самовосстановления почв, загрязненных углеводородами нефти, является очень длительным и может продолжаться более 25 лет [6].

В настоящее время для интенсификации процесса очистки почвы от загрязнения углеводородами широко используют биологические методы биоремедиации (или биологической очистки), основанные на интродукции в загрязненную почву микроорганизмов-деструкторов [7, 8]. В то же время сами интродуцируемые микроорганизмы нуждаются в защите от неблагоприятных внешних условий. Имобилизация микроорганизмов повышает их толерантность к неблагоприятным условиям [9]. Практическое применение находит в настоящее время микрокапсулирование, основанное на иммобилизации микроорганизмов-деструкторов путем адсорбции на микрокапсулах – альтернативный вариант включения в гель [10].

Цель работы – изучение эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными на микрокапсулах из полимочевины микроорганизмами-деструкторами.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиала ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Московская область, Серпуховский район, п. Большевик).

Для проведения лабораторных исследований по изучению биодеградации дизельного топлива из коллекции нефтеокисляющих микроорганизмов НИЦ ТБП были подобраны 2 штамма бактерий (*Rhodococcus sp.* шт. N1 и *Pseudomonas sp.* шт. N2), обладающих рядом полезных свойств (высокая углеводородокисляющая активность, нетоксичность, непатогенность).

Оценку безопасности штаммов проводили на базе виварного комплекса на лабораторных линиях беспородных белых мышей и крыс по общепринятым методикам. Изучение патогенных свойств выделенных штаммов было осуществлено в соответствии с международными требованиями по 4 показателям. По показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности отобранные штаммы не патогенны для теплокровных животных и могут быть отнесены к 4-му классу опасности. Следовательно, эти штаммы пригодны для использования в процессах биоремедиации без ограничений.

Исследование количественных показателей процесса биодеструкции углеводородов под действием микрокапсулированных штаммов *Rhodococcus sp.* шт. N1 и *Pseudomonas sp.* шт. N2 проводили в почвенных микрокосмах посредством моделирования условий загрязнения дерново-подзолистой почвы дизельным топливом [11].

Для приготовления модельных почвенных систем использовали дерново-подзолистую почву Серпуховского района Московской области. Для эксперимента использовали смешанные образцы почвы, отобранные из пахотного горизонта 0–20 см. Образцы почв массой 1500 г, просеянные через сито 3 мм (для максимального сохранения их природной структуры), помещали в герметически закрытые пластиковые цилиндры. Опыт в контейнерах позволил исключить поверхностную миграцию загрязнителей, дал возможность точно рассчитать дозу дизтоплива на определенную массу почвы.

Начальную влажность почвы доводили до 60% путем увлажнения водой. Дизтопливо вносили в количестве 1% от абсолютно сухой почвы. Полученную массу перемешивали до однородности. Эксперимент вели в контейнерах при температуре 20–24°C в течение 30 сут. Образцы почвы для исследований отбирали в начале опыта, через 14 и 30 сут. Определение всех параметров проводили в 3–5-кратной повторности.

Схема лабораторного эксперимента:

1. Почва + дизтопливо + *Rhodococcus sp.* шт. N1;
2. Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы *Rhodococcus sp.* шт. N1;
3. Почва + дизтопливо + *Pseudomonas sp.* шт. N2;
4. Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы *Pseudomonas sp.* шт. N2;
5. Почва + дизтопливо (контроль);
6. Чистая почва (контроль).

Культивирование микроорганизмов-деструкторов для лабораторных экспериментов проводили в жидкой питательной среде, используя «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон)» ТУ 9398-021-78095326-2006, изготовленной ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск. Выращивание микроорганизмов проводили на термостатируемой качалке до выхода культур *Rhodococcus sp.* шт. N1 и *Pseudomonas sp.* шт. N2 на стационарную фазу роста через 48 и 24 ч соответственно, при температуре 28°C и 180 об./мин. Конечная концентрация – $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл питательной среды. Используя стандарт мутности, суспензию бактерий разводили фосфатным буфером.

Для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов использовали пористые полимочевинные микрокапсулы производства ЗАО «ПироХимика». Размер диаметра микрокапсул составлял 43–60 мкм. Методом оптической световой микроскопии было установлено, что при иммобилизации бактериальные клетки локализуются на внутренних и внешних поверхностях микрокапсул. Микрокапсулирование микробных клеток проводили путем смешивания и бактериальной суспензии с концентрацией $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл в сбалансированном растворе минеральных солей (2,5 масс.% микрокапсул и 97,5 масс.%), в течение 20 минут непосредственно перед внесением в почву методом полива. Концентрация и объем вносимых микрокапсулированных и чистых

бактериальных суспензий были рассчитаны так, чтобы конечная концентрация микроорганизмов была $1,0 \times 10^7$ клеток на 1 г абсолютно сухой почвы.

Нефтепродукты из почвы экстрагировали четыреххлористым углеродом, хроматографически отделяли сопутствующие органические соединения других классов и количественно определяли нефтепродукты по интенсивности поглощения в ИК-области спектра на концентратометре КН-2М («Сибэкоприбор», г. Новосибирск) согласно методике ПНДФ 16.1:2.2.22–98 [12].

В ходе эксперимента изучали динамику размножения микроорганизмов-деструкторов в загрязненной почве (при внесении в обычном и микрокапсулированном виде), концентрацию сапрофитной микрофлоры, биологическую активность почвы (целлюлозолитическую, гидролазную, дегидрогеназную и дыхательную активность), интегральную токсичность.

Численность микроорганизмов-деструкторов в почве определяли путем посева десятикратных разведений почвенной суспензии на чашки Петри с агаризованной питательной средой из гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар) и маркерами, характерными для каждого штамма. Чашки Петри экспонировали в термостате при температуре 28°C в течение 4 сут до появления четко различимых колоний микробной культуры.

Численность сапрофитных микроорганизмов в почве определяли путем посева десятикратных разведений почвенной суспензии на чашки Петри с агаризованной питательной средой из гидролизата рыбной муки. Посевы инкубировали при 26°C. Учет выросших на агаровой питательной среде колоний проводили на 5–6-е сутки после посева. Численность сапрофитных микроорганизмов выражали в тысячах на 1 г абсолютно сухой почвы.

Интегральную (суммарную) токсичность водных вытяжек из почвы оценивали на лабораторной культуре *Daphnia magna Straus*, культивируемой в НИЦ ТБП. Биотестирование проводили в соответствии с ФР.1.39.2007.03222 [13]. Метод основан на определении изменений выживаемости дафний при воздействии токсических веществ, содержащихся в тестируемой воде, по сравнению с контролем. Критерием токсичности является достоверное отличие от контроля выживаемости дафний. При гибели 50% и более дафний водная вытяжка считается токсичной. Биотестирование проводили в климатостате, в помещении, не содержащем токсических паров или газов, при оптимальных температурном и световом режимах. Результаты биотестирования считали правильными, если гибель дафний в контроле не превышала 10% за весь период наблюдений.

При определении дегидрогеназной активности почвы в качестве субстрата использовали бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый (ТТХ), который в анаэробных условиях в присутствии дегидрогеназы, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан (ТФФ), имеющий красную окраску. Интенсивность окраски определяли фотоколориметрически [14]. Активность дегидрогеназы рассчитывали в миллиграммах ТФФ на 10 г почвы за сутки.

Гидролазную активность почвы определяли по реакции гидролиза флуоресцеина диацетата (ФДА) [15]. Навески

почвы по 1 г помещали в пробирки, приливали по 0,1 мл раствора ФДА в ацетоне (2 г/л) и 10 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,6). Время инкубации – 1 ч при 30°C. Оптическую плотность растворов определяли после центрифугирования (2000 об./мин., 3 мин.) колориметрированием при длине волны 490 нм. Показания прибора пересчитывали по калибровочной кривой в мкг ФДА $\times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$.

Для определения целлюлозоразлагающей способности почвы применяли аппликационный метод [16]: целлюлозный материал (фильтровальную бумагу), заложенный в почву в полистироловой сети, выдерживали в ней в течение 30 сут. По разнице в массе (в %) фильтровальной бумаги до и после инкубации образцов судили об интенсивности целлюлозоразлагающей активности почвы.

Эмиссия CO_2 почвой является одним из наиболее важных показателей ее биологической активности [17]. Определение скорости базального дыхания (БД) проводили в пенициллиновых флаконах, куда помещали по 2 г почвы и инкубировали при 25°C в течение 2 ч, а затем проветривали 30 мин. Во флаконы добавляли 0,4 мл воды, герметично закрывали и инкубировали при 25°C. Продолжительность инкубации – 24 ч. Концентрацию CO_2 определяли газохроматографическим методом.

Для определения субстрат-индуцированного дыхания (СИД) во флаконы помещали навеску почвы (2 г) и инкубировали в течение 2 ч при 25°C. После проветривания в течение 30 мин при комнатной температуре во флаконы добавляли по 4,0% раствор глюкозы (10 мг/г почвы) и инкубировали при 25°C в течение 3 ч. Концентрацию CO_2 определяли на газовом хроматографе. Скорость дыхания $V_{\text{СИД}}$ выражали в мкг CO_2 – С/г сухой почвы в час. Содержание углерода микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$) рассчитывали по величине субстрат-индуцированного дыхания по формуле: $C_{\text{мик}} (\text{мкг/г}) = V_{\text{СИД}} (\text{мкл } \text{CO}_2/\text{г час}) \times 40,04 + 0,37$.

Определение всех параметров проводили не менее чем в пятикратной повторности. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel 16.0 и Statistica 10.0.

При сравнении средних величин использовали критерий Стьюдента и критерий Уилкоксона (Манна-Уитни). Для оценки соответствия имеющихся экспериментальных данных нормальному закону распределения применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Критерий Стьюдента (t-критерий) применяли для сравнения друг с другом двух независимых выборок, взятых из нормально распределяющихся совокупностей. При несоответствии распределения нормальному закону использовали непараметрический критерий Манна-Уитни программы STATISTICA 10.0. Экспериментальные данные представляли в виде средних арифметических величин и их доверительных интервалов, рассчитанных с вероятностью 95%.

Результаты и обсуждение

Результаты химико-аналитического определения содержания дизельного топлива в почве в вариантах опыта и показатели эффективности биодеструкции (доля разложившегося нефтепродукта от его исходного содержания в почве, в %) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оценка результатов эффективности биодеструкции дизельного топлива

Вариант опыта	Концентрация углеводородов дизтоплива, г/кг почвы			Эффективность биодеструкции, %
	начало опыта	14 сут	30 сут	
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1		8,4 ± 0,4*	4,1 ± 0,2*	59,0 ± 2,8*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1		5,2 ± 0,3*	1,9 ± 0,1*	81,0 ± 3,9*
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	10,0 ± 0,4	7,6 ± 0,4*	3,2 ± 0,2*	68,0 ± 3,2*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2		4,3 ± 0,2*	0,8 ± 0,1*	92,0 ± 4,5*
Почва + дизтопливо (контроль)		9,7 ± 0,5*	9,4 ± 0,4*	6,0 ± 0,4*

* $p < 0,05$ – в сравнении с контрольной группой.

Таблица 2. Динамика численности сапрофитной микрофлоры в ходе процесса биоремедиации почвы, загрязненной дизтопливом, КОЕ/г почвы

Варианты опыта	Численность сапрофитной микрофлоры $M \pm n$, КОЕ/г почвы		
	начало опыта	14 сут	30 сут
Почва + диз. топливо + шт. N1	$(3,3 \pm 0,46) \times 10^6$	$(7,5 \pm 0,64) \times 10^7$	$(4,1 \pm 0,53) \times 10^7$
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	$(4,1 \pm 0,85) \times 10^6$	$(9,3 \pm 0,23) \times 10^7$	$(9,5 \pm 0,38) \times 10^7$
Почва + дизтопливо + шт. N2	$(2,9 \pm 0,51) \times 10^6$	$(4,5 \pm 0,81) \times 10^7$	$(3,3 \pm 0,24) \times 10^7$
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	$(3,5 \pm 0,46) \times 10^6$	$(4,6 \pm 0,75) \times 10^7$	$(4,3 \pm 0,64) \times 10^7$
Почва + дизтопливо (контроль)	$(4,1 \pm 0,83) \times 10^6$	$(8,7 \pm 0,75) \times 10^7$	$(5,9 \pm 0,85) \times 10^7$
Чистая почва (контроль)	$(3,3 \pm 0,75) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,48) \times 10^7$	$(2,5 \pm 0,34) \times 10^7$

M – среднее пяти измерений; n – доверительный интервал, рассчитан с вероятностью 95%.

По всем вариантам опыта в процессе биоремедиации наблюдается уменьшение содержания нефтепродукта. В контрольном варианте в ходе опыта наблюдалось естественное снижение содержания углеводородов (6% в течение 30 дней), что можно объяснить деятельностью почвенного микробного сообщества. В вариантах с интродуцированными бактериями-деструкторами снижение содержания нефтепродукта выражено сильнее. При внесении в почву микрокапсулированных и свободных клеток бактерий *Pseudomonas sp.* шт. N2 интенсивность деградации дизтоплива превышала таковую по отношению к контролю в 15,3 и 11,3 раза соответственно. При внесении в почву микрокапсулированных клеток *Rhodococcus sp.* шт. N1 деградация дизтоплива была больше, чем в контроле, в 13,5 раза, а в случае применения чистой суспензии клеток – в 9,8 раза.

Результаты исследований показали (рис. 1, 2), что микрокапсулированные микроорганизмы при внесении в почву

активнее размножаются в 1,5–2 раза, чем некапсулированные, разлагают нефтепродукты до допустимых значений.

В связи с тем, что концентрация загрязнителя в почве в результате деятельности микроорганизмов-деструкторов значительно снижается, происходит размножение сапрофитной микрофлоры (табл. 2). Судя по числу выросших колоний, наибольшая численность микроорганизмов в каждом варианте эксперимента обнаружена на 14-е сутки культивирования. Последующее уменьшение числа выросших колоний, вероятно, связано с истощением питания и накоплением продуктов метаболизма.

Наряду с ускорением деструкции дизельного топлива в почве микробная биоремедиация способствовала и снижению токсичности. Биотестирование на дафниях показало, что интегральная токсичность почвы в течение биоремедиации постепенно снижается. При этом почва, обработанная

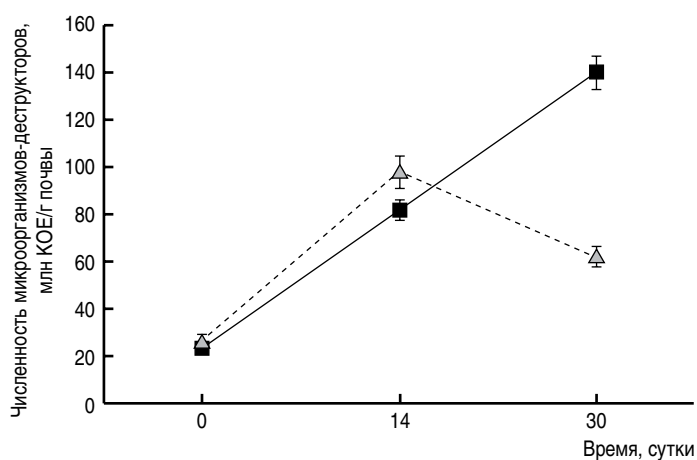


Рис. 1. Динамика численности интродуцированных в почву микроорганизмов-деструкторов *Rhodococcus sp.* шт. N1.

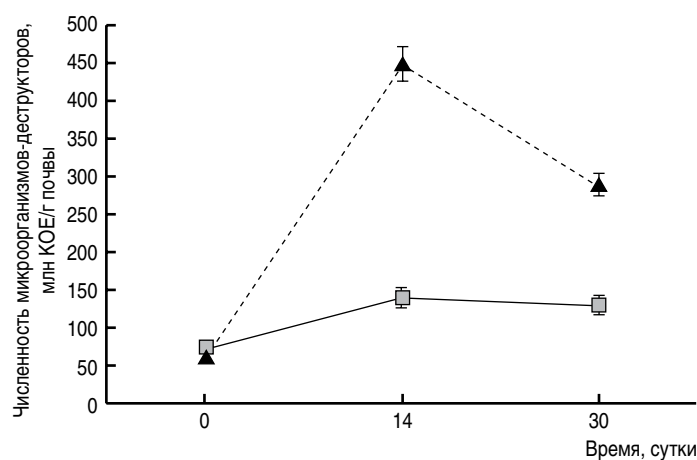


Рис. 2. Динамика численности интродуцированных в почву микроорганизмов-деструкторов *Pseudomonas sp.* шт. N2.

Таблица 3. Интегральная токсичность почвы при обработке микроорганизмами-деструкторами

Вариант опыта	Количество выживших дафний из 30 шт.		Гибель дафний к контролю, в %	Оказывает (не оказывает) острое токсическое действие
	в контроле	в опыте		
<i>В день внесения микроорганизмов</i>				
Чистая почва (контроль)	30	30	0	не оказывает
Почва + дизтопливо 1%	30	0	100	оказывает
<i>На 14-е сутки</i>				
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	30	12	60	оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	30	15	50	оказывает
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	30	11	63	оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	30	14	53	оказывает
Почва + дизтопливо (контроль)		5	83	оказывает
Почва чистая (контроль)	30	30	0	не оказывает
<i>На 30-е сутки</i>				
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	30	16	47	не оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	30	19	37	не оказывает
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	30	15	50	оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	30	21	30	не оказывает
Почва + дизтопливо (контроль)	30	9	70	оказывает
Почва чистая (контроль)	30	30	0	не оказывает

микроорганизмами-деструкторами, к 30-м суткам становится нетоксичной (табл. 3).

Объективным показателем, позволяющим оперативно оценить биологическое состояние и токсичность почвы при разных уровнях содержания в ней нефтяных загрязнений, является активность почвенного микробиоценоза.

Проведена серия экспериментов по изучению влияния внесения микроорганизмов-деструкторов на активность ряда ферментов дерново-подзолистой почвы.

Результаты оценки дегидрогеназной активности почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1, *Pseudomonas sp.* шт. N2 представлены на рис. 3, 4.

После внесения дизельного топлива в чистую почву (контроль) в лабораторном исследовании дегидрогеназная активность снизилась с 41,8 до 14,1 мг ТФФ/10 г почвы × 24 ч⁻¹.

Спустя 30 сут этот показатель в варианте без внесения микроорганизмов-деструкторов увеличился в 1,5 раза, в то время как присутствие микрокапсулированных микроорганизмов-деструкторов в почве увеличило дегидрогеназную активность в 2,5–2,7 раза, а в опытах со свободными микроорганизмами – в 2,1–2,2 раза.

Гидролазы, участвуя в реакциях гидролитического распада высокомолекулярных соединений почвы, играют важную роль в снабжении микроорганизмов легкоусвояемыми продуктами гидролиза.

При оценке гидролазной активности почвы в процессе микробной биоремедиации были получены следующие результаты (рис. 5, 6).

Загрязнение почвы дизельным топливом по отношению к чистой контрольной почве снизило ее гидролазную активность. Общая активность гидролаз, оцененная методом

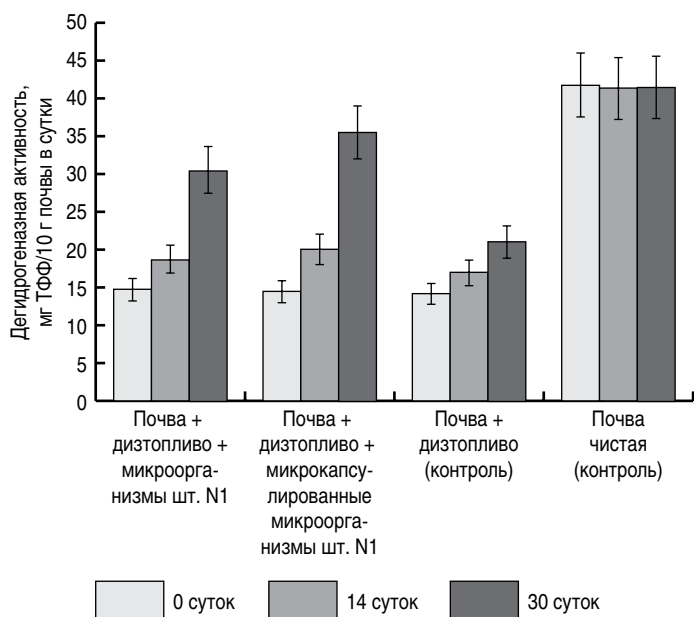


Рис. 3. Дегидрогеназная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1.

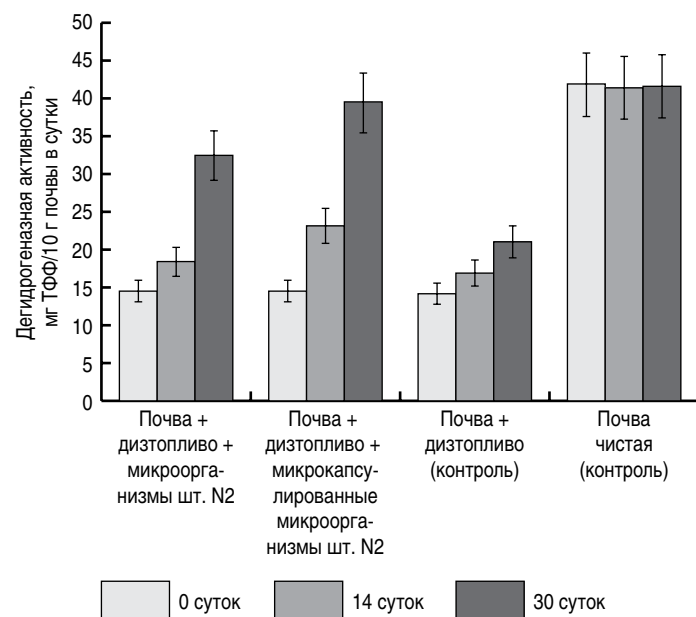


Рис. 4. Дегидрогеназная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Pseudomonas sp.* шт. N2.

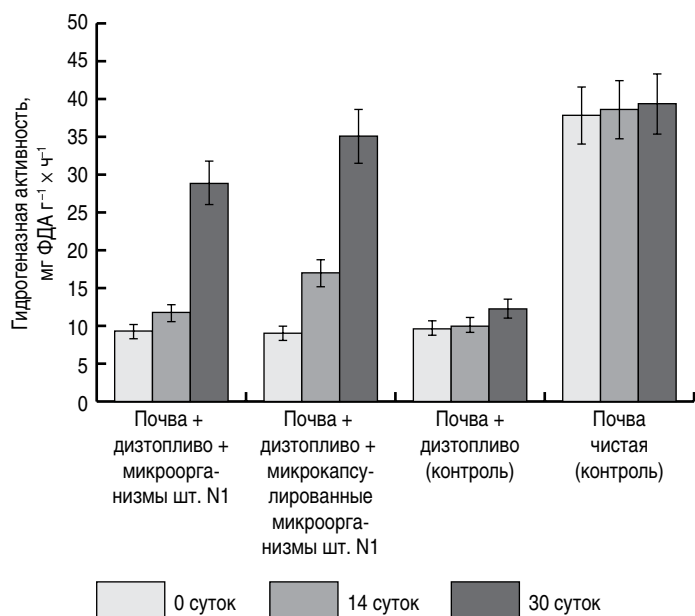


Рис. 5. Гидролазная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1.

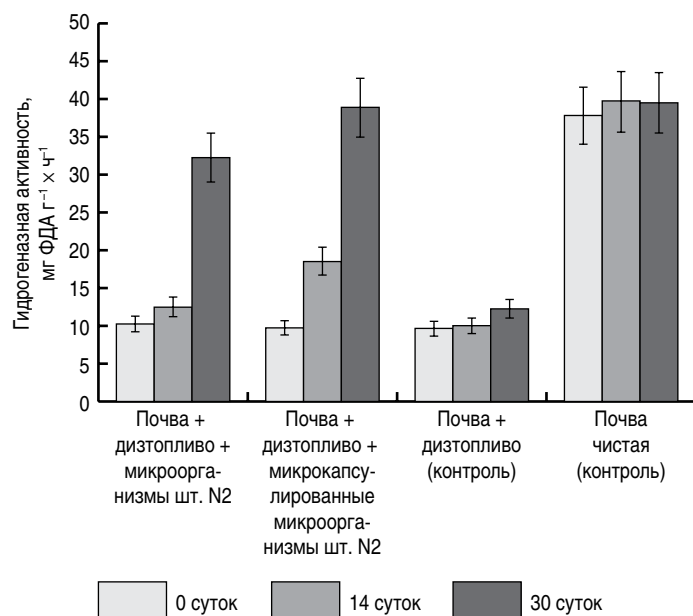


Рис. 6. Гидролазная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Pseudomonas sp.* шт. N2.

гидролиза ФДА, после внесения в чистую почву дизтоплива снизилась с $37,8 \pm 0,9$ до $9,6 \pm 1,2$ мг ФДА \times г $^{-1}$ \times ч $^{-1}$. После 30 сут очистки почвы этот показатель в варианте без внесения микроорганизмов-деструкторов увеличился в 1,3 раза, в то время как присутствие микрокапсулированных и свободных микроорганизмов-деструкторов в почве увеличило гидролазную активность в 3,9–4,1 и 3,1 раза соответственно.

Загрязнение чистой почвы дизельным топливом приводит также к снижению ее целлюлозоразлагающей активности (рис. 7, 8).

Спустя 30 сут проведение биоремедиационных мероприятий способствовало увеличению целлюлозоразлагающей активности почвы. При этом в вариантах с внесением микрокапсулированных бактерий-деструкторов интенсивность разложения целлюлозы (50%) соответствовала уровню чистой почвы.

Интенсивность дыхания почвы является одним из основных показателей, определяющих биологическую активность почвы. Под дыханием почвы понимают интенсивность эмиссии углекислого газа из почвы, которая определяется скоростью процессов биодеструкции органическо-

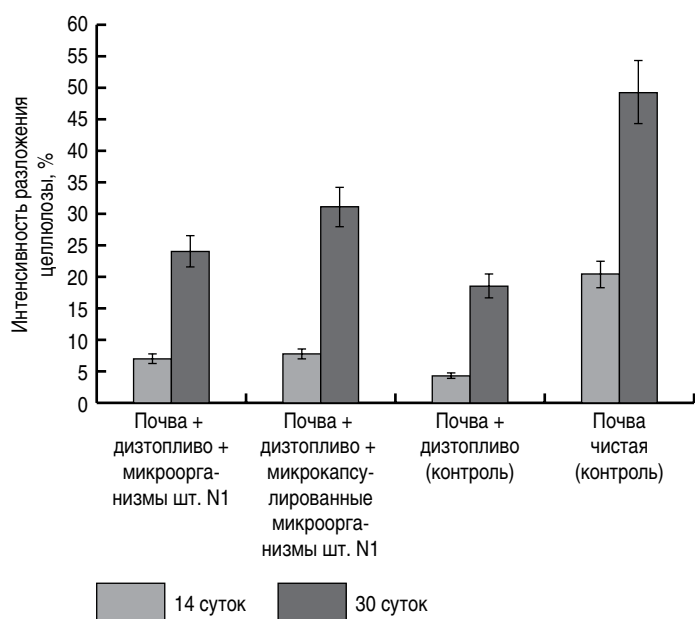


Рис. 7. Интенсивность разложения целлюлозы в почве, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1.

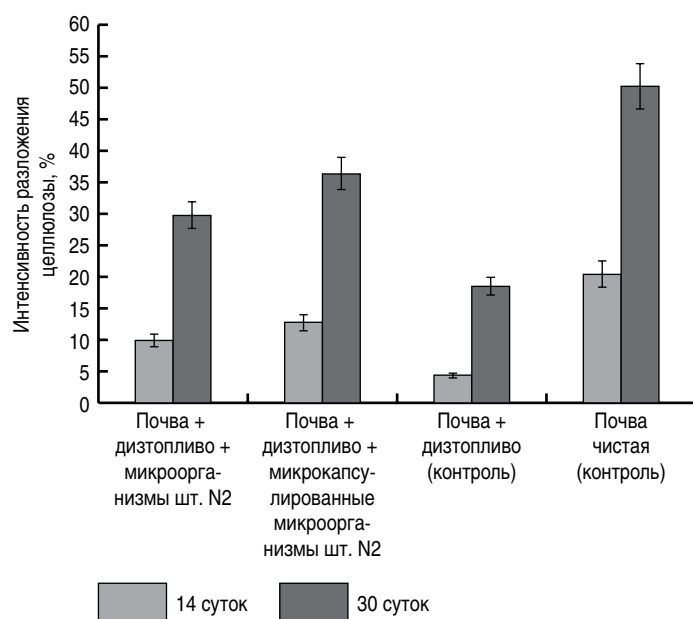


Рис. 8. Интенсивность разложения целлюлозы в почве, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Pseudomonas sp.* шт. N2.

Таблица 4. Базальное (БД) и субстрат-индуцированное (СИД) дыхание почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе микробной биоремедиации

Варианты опыта	V _{БД} , мкг СО ₂ – С/г почвы в час			V _{СИД} , мкг СО ₂ – С/г почвы в час		
	начало опыта	14 сут	30 сут	начало опыта	14 сут	30 сут
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	3,42 ± 0,12*	3,59 ± 0,16*	3,76 ± 0,18*	8,96 ± 0,24*	11,38 ± 0,37*	18,98 ± 0,12*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	3,36 ± 0,12*	3,41 ± 0,08*	3,98 ± 0,21*	8,95 ± 0,58*	14,75 ± 0,40*	23,58 ± 1,01*
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	3,04 ± 0,11*	3,48 ± 0,09*	3,51 ± 0,13*	8,94 ± 0,21*	11,25 ± 0,44*	19,60 ± 0,29*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	3,13 ± 0,08*	3,54 ± 0,11*	4,3 ± 0,16*	8,73 ± 0,43*	15,84 ± 0,65*	24,37 ± 0,18*
Почва + дизтопливо (контроль)	3,03 ± 0,09*	2,39 ± 0,08*	2,60 ± 0,09*	8,91 ± 0,20*	10,41 ± 0,51*	12,97 ± 0,77*
Почва чистая (контроль)	5,37 ± 0,10	4,46 ± 0,17	4,71 ± 0,09	26,91 ± 0,14	27,58 ± 0,72	27,82 ± 1,10

*p < 0,05 – в сравнении с контролем (чистая почва).

Таблица 5. Содержание углерода микробной биомассы (С_{мик}) и значения коэффициента микробного дыхания почвы (Q_R), загрязненной дизтопливом, в ходе микробной биоремедиации

Вариант опыта	Q _R , БД/СИД			С _{мик} , мкг СО ₂ – С/г почвы		
	начало опыта	14 сут	30 сут	начало опыта	14 сут	30 сут
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	0,38 ± 0,02*	0,31 ± 0,01*	0,20 ± 0,02	359 ± 10*	456 ± 12*	760 ± 5*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	0,37 ± 0,02*	0,23 ± 0,01*	0,17 ± 0,01	359 ± 23*	590 ± 16*	944 ± 40*
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	0,39 ± 0,02*	0,31 ± 0,01*	0,18 ± 0,01	359 ± 8*	470 ± 18*	785 ± 12*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	0,36 ± 0,02*	0,22 ± 0,01*	0,18 ± 0,01	350 ± 17*	634 ± 26*	976 ± 37*
Почва + дизтопливо (контроль)	0,34 ± 0,01*	0,23 ± 0,02*	0,22 ± 0,02*	357 ± 27*	417 ± 20*	519 ± 31*
Почва чистая (контроль)	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	1077 ± 29	1104 ± 29	1114 ± 44

*p < 0,05 – в сравнении с контрольной группой.

го вещества. В процессе лабораторных исследований было установлено, что при загрязнении дизельным топливом (10 г/кг) достоверно снижается интенсивность почвенного дыхания с 5,37 ± 0,10 до 3,03 ± 0,09 мкг СО₂ – С/г почвы в час.

В процессе микробной биоремедиации базальное дыхание спустя 30 сут достоверно увеличилось только в вариантах с интродукцией микрокапсулированных бактерий-деструкторов в 1,2–1,4 раза. Убыль углеводов в вариантах почвы способствовала интенсификации субстрат-индуцированной активности микрокапсулированными и свободными микроорганизмами-деструкторами в 2,6–2,8 и 2,1–2,2 раза соответственно по сравнению с началом эксперимента (табл. 4).

Коэффициент дыхательной активности микроорганизмов Q_R – важный индикатор состояния и развития микробного сообщества почвы. Согласно литературным данным [18], величина Q_R почв естественных биоценозов при оптимальных условиях варьирует в пределах 0,1–0,2. Величины Q_R, превышающие 0,2–0,3, указывают на неблагоприятные антропогенные или климатические воздействия. В вариантах опыта по микробной биоремедиации, где применялись микрокапсулированные штаммы, а также в контроле (чистая почва) значения Q_R равнялись 0,17, 0,18, 0,17 соответственно (табл. 5).

К числу значимых эколого-физиологических показателей, характеризующих микробное сообщество почвы, относится содержание углерода микробной биомассы С_{мик}. Загрязнение дерново-подзолистой почвы дизельным топливом в начале эксперимента привело к снижению содержания микробного углерода в почве (см. табл. 5) в 3,0 раза.

Через 30 сут инкубации значения С_{мик} увеличились во всех вариантах, содержащих дизельное топливо, причем в наи-

большей степени в опыте с микрокапсулированными микроорганизмами-деструкторами – в 2,6–2,8 раза.

Таким образом, в экспериментах по микробной биоремедиации почвы, загрязненной дизельным топливом, выявлено увеличение численности и биоремедиационного потенциала микробного почвенного сообщества.

Заключение

Внесение в дерново-подзолистую почву дизельного топлива негативно повлияло на биологическую активность почвы. В начале эксперимента в вариантах почвы с дизтопливом, по сравнению с контролем, установлено снижение дегидрогеназной активности, активности гидролаз (по реакции гидролиза ФДА), целлюлозоразлагающей активности, базального и субстрат-индуцированного дыхания почвы, содержания углерода микробной биомассы, а также численности сапрофитных микроорганизмов.

В ходе микробной биоремедиации рост биологической активности, увеличение численности интродуцированных бактерий-деструкторов и сапрофитной микрофлоры на фоне снижения концентрации углеводов и интегральной токсичности загрязненной почвы делает возможным успешное проведение биоремедиации. Применение микрокапсулированных бактерий – деструкторов *Pseudomonas sp.* шт. N2 и *Rhodococcus sp.* шт. N1 в концентрации 10⁷ КОЕ/г почвы для деструкции углеводов дизельного топлива в 1,4 раза эффективнее, чем внесение суспензии микроорганизмов в той же концентрации. Микрокапсулы из полимочевины способствуют увеличению биологической активности и приживаемости бактерий-деструкторов в загрязненной почве.

Таким образом, использование микрокапсулированных микроорганизмов-деструкторов способствует повышению

эффективности биоремедиации загрязненных почв. Полученные результаты позволяют рекомендовать использовать для биоремедиации почв, загрязненных дизельным топливом, микроорганизмы-деструкторы, иммобилизованные на микрокапсулах из полимочевины.

Литература

1. Куранов ПН, Алексахина ВВ, Новикова ТМ. Загрязнение градопромышленных территорий нефтепродуктами и значение этого процесса для биосферы земли. Биосферная совместимость: человек, регион, технологии. 2016; 3(15):3-17.
2. Филатов ДА, Овсянникова ВС. Загрязнения окружающей среды нефтяными углеводородами: проблемы и решения. Экологический вестник России. 2017;6:8-12.
3. Gennadiev AN, Pikovskii YI, Tsi bart AS, Smirnova MA. Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). Eurasian Soil Science. 2015;48(10): 1076-1089. DOI: 10.1134/S1064229315100026.
4. Ким СЛ, Самигуллина ГЗ. Негативное воздействие нефтяных углеводородов на почву. Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2015; 9:8-11.
5. Шевченко АА, Кулагин АА, Григоренко ЛВ. Гигиеническая оценка влияния дизельного топлива на микробиоценоз чернозема обыкновенного. Гигиена и санитария. 2016;95(10):942-945. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-10-942-945
6. Баландина АВ, Кузнецов ДБ, Бурдова ЛВ. Самовосстановление нефтезагрязненных почв. Успехи современного естествознания. 2014;4:85-8.
7. Янкевич МИ, Хадеева ВВ, Мурыгина ВП. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра. Биосфера. 2015;7(2):199-208.
8. Kis A, Laczi K, Zsíros S, Kos P, Tengolics R, Boundedjoun N, et al. Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Acta Microbiol Immunol Hung. 2017 Dec 1;64(4): 463-482. DOI: 10.1556/030.64.2017.037.
9. Демаков ВА, Максимова ЮГ, Максимов АЮ. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты. Биотехнология. 2008;2:30-45.
10. Третьякова СЭ. Создание биопрепаратов на основе штаммов-деструкторов пестицидов прометрина и паратион-метила и испытание технологии ремедиации загрязненных почв. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06. Саратов, 2013, 21 с.
11. Vidican R, Sandor V. Microcosm Experiments as a Tool in Soil Ecology Studies. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture. 2015;72(1):319-320. DOI: 10.15835/buasvmcn-agr: 10618
12. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органо-минеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНДФ 16.1:2.2.22-98. М., 1998, 15 с.
13. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости дафний: Федер. реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03222. М.: Акварос; 2007, 41 с.
14. Хазиев ФХ. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука; 2005, 252 с.
15. Якушев АВ, Бызова БА. Гидролазная активность как показатель состояния микробного сообщества вермикомпоста. Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2009;2:41-6.
16. Звягинцев ДГ. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ; 1991, 231 с.
17. Ананьева НД, Сусьян ЕА, Гавриленко ЕГ. Особенности определения углерода микробной биомассы почвы методом субстрат-индуцированного дыхания. Почвоведение. 2011;11:1327-33.

18. Вершинин АА, Петров АМ, Игнат'ев ЮА, Шагидуллин РР. Дыхательная активность дерново-карбонатной почвы, загрязненной дизельным топливом. Вестник Казанского технологического университета. 2011;7:168-74.

References

1. Kuranov PN, Aleksashina VV, Novikova TM. Pollution industrial areas and oil products the value of this process the earth's biosphere. Biospheric compatibility: human, region, technologies. 2016;3(15):3-17. (In Russian).
2. Filatov DA, Ovsyannikova VS. Zagryazneniya okruzhayushchei sredy neftyanymi uglevodorodami: problemy i resheniya. Ekologicheskii vestnik Rossii. 2017;6: 8-12. (In Russian).
3. Gennadiev AN, Pikovskii YI, Tsi bart AS, Smirnova MA. Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). Eurasian Soil Science. 2015; 48(10):1076-1089. DOI: 10.1134/S1064229315100026.
4. Kim SL, Samigullina GZ. The negative impact of petroleum hydrocarbons on soil. Environmental protection in oil and gas complex. 2015;9:8-11. (In Russian).
5. Shevchenko AA, Kulagin AA, Grigorenko LV. Hygienic assessment of the impact of diesel fuel on the ordinary black soil microbiocenosis. Hygiene and sanitation. 2016; 95(10):942-945. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-10-942-945 (In Russian).
6. Balandina AV, Kuznecov DB, Burdova LV. Self-healing contaminated soil. Advances in Current Natural Sciences. 2014;4:85-8. (In Russian).
7. Yankevich MI, Khadeyeva VV, Murygina VP. Bioremediation of soils: yesterday, today and tomorrow. Biosfera. 2015;7(2):199-208. (In Russian).
8. Kis A, Laczi K, Zsíros S, Kos P, Tengolics R, Boundedjoun N, et al. Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Acta Microbiol Immunol Hung. 2017 Dec 1; 64(4): 463-482. DOI: 10.1556/030.64.2017.037.
9. Demakov VA, Maksimova YuG, Maksimov AYU. Immobilization of Microbial cells: Biotechnological Aspects. Applied Biochemistry and Microbiology Biotechnology in Russia. 2008;2:40-62. (In Russian).
10. Tret'yakova SE. Sozdanie biopreparatov na osnove shtammov-destruktorov pestitsidov prometrina i paration-metila i ispytanie tekhnologii remediatsii zagryaznennykh pochv. Diss. Saratov, 2013, 21 p. (In Russian).
11. Vidican R, Sandor V Microcosm Experiments as a Tool in Soil Ecology Studies. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture. 2015;72(1):319-320. DOI: 10.15835/buasvmcn-agr: 10618
12. Methods of measuring the mass fraction of petroleum products in mineral, organogenic, organomineral soils and bottom sediments by IR spectroscopy. PNDP 16.1:2.2.22-98. Moscow, 1998, 15 p. (In Russian).
13. Methods of determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, waste mortality. Federal register 1.39.2007.03222. Moscow: "Akvaros" Publ.; 2007, 41 p. (In Russian).
14. Khaziev FKh. Metody pochvennoi enzimologii. Moscow: "Nauka" Publ.; 2005, 252 p. (In Russian).
15. Yakushev AV, Byzov BA. Hydrolases as a measure of microbial activities of vermicomposting substrates. Moscow University Soil Science Bulletin. 2009;2: 41-6. (In Russian).
16. Zvyagintsev DG. Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimii. Moscow: Publishing of Moscow State University; 1991, 231 p. (In Russian).
17. Ananyeva ND, Susyan EA, Gavrilenko EG. Determination of the soil microbial biomass carbon using the method of substrate-induced respiration. Eurasian Soil Science. 2011;44(11):1215-21. (In Russian).
18. Vershinin AA, Petrov AM, Ignat'ev YuA, Shagidullin RR. Dykhatel'naya aktivnost' dernovo-karbonatnoi pochvy, zagryaznennoi dizel'nym toplivom. Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2011;7:168-74. (In Russian).

Информация об авторах:

Жариков Геннадий Алексеевич, доктор биологических наук, начальник отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Крайнова Ольга Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения токсичности in vitro отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Дядищева Валентина Петровна, научный сотрудник лаборатории изучения токсичности in vitro отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Челпых Людмила Васильевна, младший научный сотрудник отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Information about authors:

Gennady A. Zharikov, Dr.Sc. (Biology), Head of the Department of Ecological Biotechnology at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

Olga A. Krainova, PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory for in Vitro Toxicity Studies in the Ecological Biotechnology Department at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

Valentina P. Dyadishcheva, researcher of Laboratory for in Vitro Toxicity Studies in the Ecological Biotechnology Department at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

Lyudmila V. Chelpykh, junior researcher of Ecological Biotechnology at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

НОВОСТИ НАУКИ

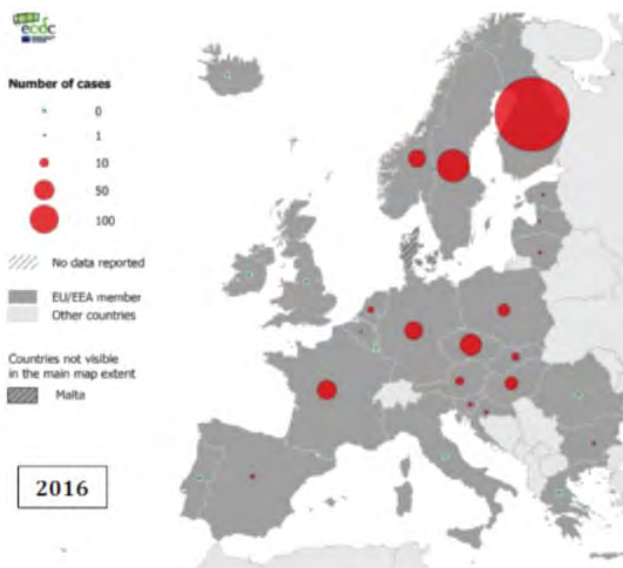
Новые данные о возбудителе туляремии

Недавно опубликована диссертация, посвященная изучению вспышек туляремии в европейских странах.

Исследованы пространственно-временные аспекты генетического разнообразия *F. tularensis*. В результате анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) 205 геномов *F. tularensis* установлено, что туляремия распространялась с востока на запад по Европейскому континенту. В период с 1947 по 2012 гг. темпы эволюции возбудителя не поддавались определению. Однако в очагах свежих вспышек скорость была заметно выше: 0,4 SNPs/геном/год.

Обнаружена способность возбудителя *F. tularensis* выживать в физиологическом растворе в течение четырех лет без питательных веществ.

Представлены данные, дающие новое понимание закономерностей распространения и локальной персистенции туляремии. Это важно для интерпретации молекулярно-эпидемиологических исследований заболевания. В более широком контексте результаты демонстрируют, как пространственное рассредоточение и влияние микробного семенного банка могут способствовать разнообразию возбудителя болезни. Описана концепция для определения источника образцов *F. tularensis*.



Francisella tularensis: persistence, dissemination and source attribution: a theoretical and computational approach. CK Dwibedi. Umeå University, 2019

Микробный пейзаж при гнойно-септических заболеваниях и антибиотикорезистентность выделенных микроорганизмов

Ю.Н.Захарьевская

БУЗ УР «Сарапульская городская больница» Министерства здравоохранения Удмуртской Республики, Сарапул, Удмуртская Республика

В работе представлены материалы по изучению микробного пейзажа при гнойно-септических заболеваниях. Определены основные возбудители, частота их выделения, а также чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам. Делается вывод, что микробиологический мониторинг необходим для определения преобладающей микрофлоры и выявления уровня антибиотикорезистентности с целью проведения адекватной и рациональной терапии тяжелых больных до получения антибиотикограммы.

Ключевые слова: микробиологический мониторинг, антибиотикорезистентность, рациональное лечение, микробный пейзаж, гнойно-септические заболевания

Для цитирования: Захарьевская Ю.Н. Микробный пейзаж при гнойно-септических заболеваниях и антибиотикорезистентность выделенных микроорганизмов. Бактериология. 2019; 4(1): 17–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-17-20

Microbial landscape of festering-septic diseases and antibiotic resistance of the selected strains

Yu.N.Zakharyevskaya

Sarapul City Hospital of the Ministry of Health of the Udmurt Republic, Sarapul, Udmurt Republic

The research represents materials of studying microbial landscape of festering-septic diseases. The main pathogens, the frequency of their allocation, and also the sensitivity of the selected strains to antibiotics have been determined. It is concluded that the microbiological monitoring is necessary to determine the predominant microflora and identification of antibiotic resistance in order to conduct an adequate and rational therapy of severe patients before receiving an antibiogram.

Keywords: microbiological monitoring, antibiotic resistance, rational therapy, microbial landscape, festering-septic diseases

For citation: Zakharyevskaya Yu.N. Microbial landscape of festering-septic diseases and antibiotic resistance of the selected strains. Bacteriology. 2019; 4(1): 17–20. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-17-20

Проблема гнойно-септических инфекций остается в современных условиях одной из наиболее острых, приобретая все большую эпидемиологическую, экономическую и социальную значимость [1–3]. Наряду с этим возрастает внимание к проблеме резистентности микроорганизмов к антибиотикам, которая становится одним из факторов, приводящим к сдерживанию широкого использования антибиотиков в медицинской практике [4]. В результате увеличения числа антимикробных препаратов расширился спектр устойчивости и сформировались множество устойчивых штаммов [5]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 29 января 2018 г. опубликовала первые данные эпиднадзора об устойчивости к противомикробным препаратам, свидетельствующие о высоком уровне устойчивости к анти-

биотикам ряда серьезных бактериальных инфекций в странах как с высоким, так и с низким уровнем доходов. Согласно данным новой Глобальной системы по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам (GLASS) ВОЗ, около полумиллиона человек с подозрением на бактериальную инфекцию в 22 странах столкнулись с устойчивостью к антибиотикам. В связи со сложившейся ситуацией эксперты ВОЗ призывают все страны создать надежные системы эпиднадзора для выявления лекарственной устойчивости, данные из которых будут предоставляться в глобальную систему [6].

Целью данной работы является изучение общей картины этиологии гнойно-септических инфекций и антибиотикорезистентности выделенных возбудителей.

Для корреспонденции:

Захарьевская Юлия Николаевна, врач-бактериолог
БУЗ УР «Сарапульская городская больница»
Министерства здравоохранения Удмуртской Республики

Адрес: 427967, Удмуртская Республика, Сарапул, ул. Гагарина, 67
Телефон: (34147) 4-06-42
E-mail: julia18rus@rambler.ru

Статья поступила 21.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Yulia N. Zakharyevskaya, bacteriologist, Sarapul City Hospital
of the Ministry of Health of the Udmurt Republic

Address: 67 Gagarin str., Sarapul, Udmurt Republic, 427967, Russian Federation
Phone: (34147) 4-06-42
E-mail: julia18rus@rambler.ru

The article was received 21.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

Материалы и методы

В ходе работы были использованы данные бактериологических исследований биологического материала от пациентов БУЗ УР «Сарапульская городская больница» МЗ УР за 2016–2018 гг. Отделения гнойной хирургии многопрофильных ЛПУ, а также учреждения родовспоможения (объекты с высоким риском формирования, циркуляции госпитальных штаммов) [2, 3]. Было исследовано 1005 клинических образцов. 767 образцов биоматериала было получено от пациентов из отделения гнойной хирургии, операционного блока и хирургического кабинета поликлиники. Исследовали кровь, пунктаты и мазки из ран больных гнойно-септическими заболеваниями различной локализации (флегмоны, абсцессы, гангрены, язвы, мазки и жидкость из брюшной полости, взятые во время операции). 238 образцов биоматериала поступило на исследование из гинекологического стационара и родильного дома – кровь (79 образцов), материал из брюшной полости и полости матки, взятый при гинекологических операциях и кесаревом сечении (110 образцов), мазки из пупочных катетеров новорожденных (49 мазков).

Сбор материала осуществлялся стерильными зондами-тампонами с транспортной средой Amies (Италия, Россия) и доставлялся в бактериологическую лабораторию в течение 2 ч с момента сбора. В лаборатории осуществлялась сортировка материала, посев на питательные среды согласно Приказу №535 от 22 апреля 1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Идентификация микроорганизмов проводилась в автоматическом режиме с определением чувствительности к антибиотикам на бактериологическом анализаторе WalkAway-40. Клинические образцы крови инкубировали в анализаторе ВАСТЕС 9050, позволяющем быстро определять наличие бактерий и грибов в клинических образцах крови. А также исследования проводились рутинными методами с использованием коммерческих тест-систем Энтеро-24, Энтеро-12, ПБДЭ, «ДС-ДИФ-НЕФЕРМ» (НПО «Диагностические системы», Россия). При определении чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом использовали стандартизованные коммерческие диски (ООО НИЦФ, Санкт-Петербург). Исследования проводили согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2016–2018).

Результаты и обсуждение

Анализ микробного пейзажа при гнойно-септических заболеваниях в отделениях и кабинетах хирургического и акушерско-гинекологического профиля в Сарапульской городской больнице выявил преобладающие патогены (таблица).

Анализ выявил ведущую роль *Staphylococcus aureus* в этиологии гнойно-септических инфекций. На втором месте по частоте выявления бактерии группы *Enterobacteriales*. Значительную долю составляют неферменти-

Таблица. Результаты анализа микробного пейзажа

Патоген	Количество штаммов	% выделения
<i>Staphylococcus aureus</i>	203	20
Группа <i>Enterobacteriales</i> :	149	14,8
<i>Escherichia coli</i>	89	
<i>Proteus spp.</i>	18	
<i>Serratia spp.</i>	17	
<i>Klebsiella spp.</i>	12	
<i>Citrobacter spp.</i>	11	
<i>Enterobacter spp.</i>	2	
Коагулазонегативные стафилококки	128	12,7
Неферментирующие ГОБ	61	6
<i>Enterococcus spp.</i>	46	4,5
<i>Streptococcus spp.</i>	40	3,9

рующие грамотрицательные бактерии, среди которых подавляющее большинство принадлежали к *Pseudomonas spp.* – 38 штаммов. Кроме того, были выделены *Acinetobacter spp.* – 19 штаммов, *Stenotrophomonas maltophilia* – 2 штамма, *Alcaligenes spp.* – 2 штамма. Велика роль и других грамположительных кокков – коагулазонегативных стафилококков (CNS), стрептококков и энтерококков, которые были выделены как в роли самостоятельного возбудителя, так и в микробных ассоциациях как сопутствующая микрофлора.

Мониторинг резистентности стафилококков проводился в отношении пенициллина, метициллина, ванкомицина, фторхинолонов, макролидов, аминогликозидов, цефалоспоринов (рис. 1, 2).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой резистентности данного возбудителя к пенициллинам (более 50% выделенных штаммов), макролидам. Достаточно высок процент метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* (26%). Эффективными препаратами являются ванкомицин, фторхинолоны, аминогликозиды.

Коагулазонегативные стафилококки отличаются высоким уровнем резистентности ко многим группам антибиотиков, сохраняют чувствительность к ванкомицину. В работах многих исследователей последних десятилетий отмечена роль CNS как самостоятельных возбудителей инфекций, в том числе внутрибольничных инфекций в хирургических стационарах, учреждениях родовспоможения [2]. Однако по-прежнему спорным представляется вопрос об этиологической значимости CNS с учетом широкой распространенности носительства этих микроорганизмов, в том числе как представителей нормофлоры.

Следует отметить, что среди выделенных штаммов гемолитические стрептококки группы А сохраняют чувствительность к «простым» пенициллинам и фторхинолонам, среди стрептококков групп В и С резистентность к этим препаратам возрастает. Для лечения стоит применять пенициллины, цефалоспорины и фторхинолоны и не следует использовать макролиды и аминогликозиды (рис. 3).

Приобретение и распространение множественной лекарственной устойчивости энтерококков вследствие селективного давления антибиотиков на нормальную микрофлору в процессе интенсивной, часто нерациональной антибиотикотерапии является серьезной клинической и экологической проблемой современной медицины [7]. Неэффективными в отношении энтерококков оказались «простые»

Микробный пейзаж при гнойно-септических заболеваниях и антибиотикорезистентность выделенных микроорганизмов



Рис. 1. Антибиотикорезистентность *Staphylococcus aureus* (%).

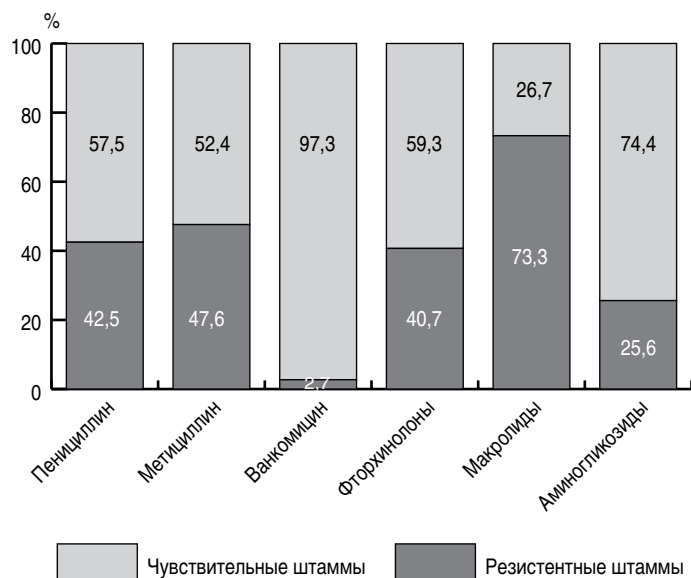


Рис. 2. Антибиотикорезистентность коагулазонегативных стафилококков (%).

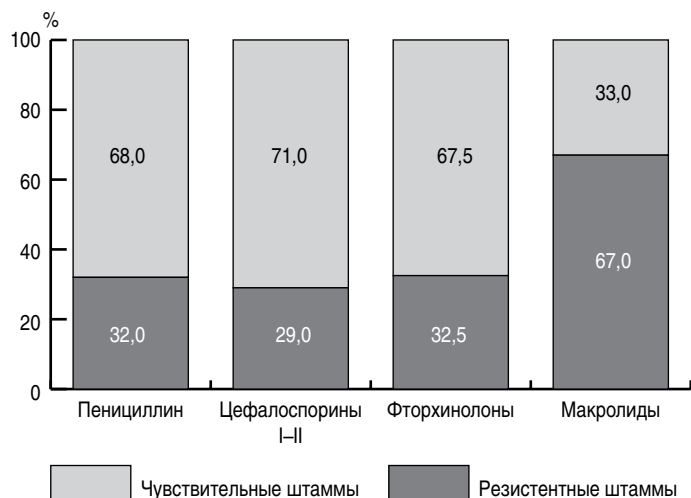


Рис. 3. Антибиотикорезистентность стрептококков (%).

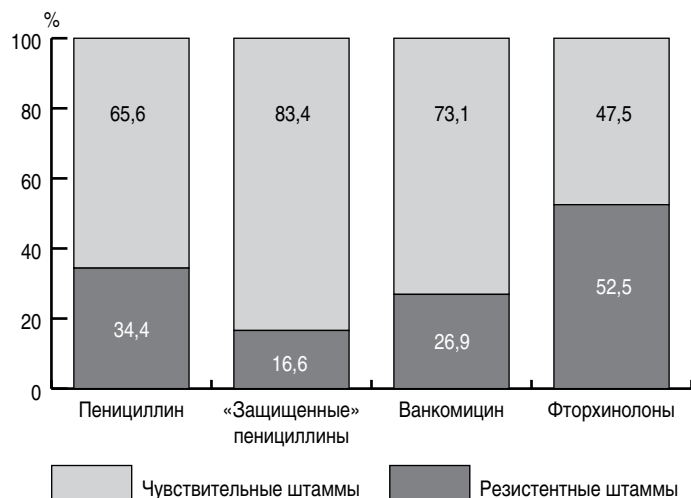


Рис. 4. Антибиотикорезистентность энтерококков (%).



Рис. 5. Антибиотикорезистентность энтеробактерий (%).

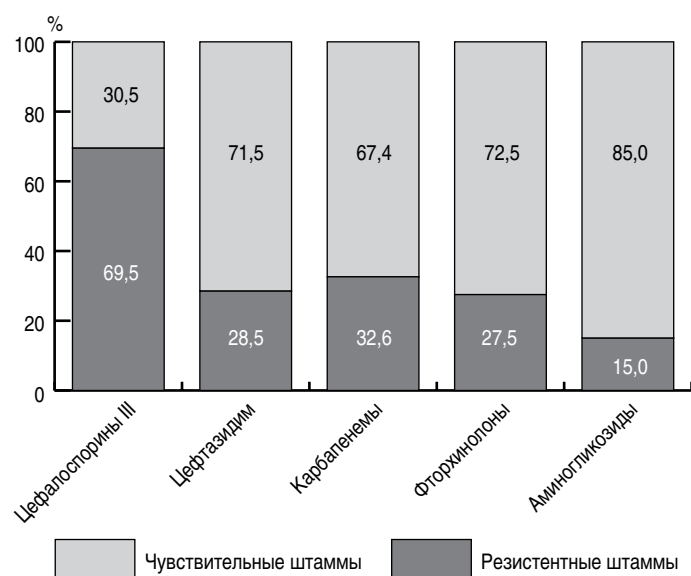


Рис. 6. Антибиотикорезистентность *Pseudomonas aeruginosa* (%).

пенициллины, фторхинолоны. Необходимо также учитывать видовую антибиотикорезистентность среди некоторых видов энтерококков к аминогликозидам и цефалоспорином [8]. Препаратами выбора могут быть «защищенные» пенициллины. Ванкомицинрезистентные энтерококки составили 26,9% (рис. 4).

Энтеробактерии, выделенные при гнойно-септических заболеваниях у пациентов хирургического и акушерско-гинекологического профиля, отличались высокой резистентностью к амоксицилину/клавуланату, цефалоспорином III поколения, в меньшей степени – к аминогликозидам и фторхинолонам. Эффективными оказались карбапенемы (рис. 5).

Неферментирующие грамотрицательные бактерии в подавляющем большинстве представлены *Pseudomonas aeruginosa*. Резистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в настоящее время является серьезной терапевтической проблемой [9]. Из всех антибиотиков, включая β-лактамы, наименьший уровень устойчивости отмечен к аминогликозидам. Антибактериальные препараты, активные в отношении синегнойной палочки, в порядке убывания активности распределяются следующим образом: фторхинолоны > цефтазидим > карбапенемы (рис. 6).

Заключение

При проведении анализа микробного пейзажа при гнойно-септических заболеваниях могут быть выявлены преобладающие патогены в зависимости от профиля стационара, а определение антибиотикорезистентности выделенных бактерий может выявить госпитальные штаммы, способные вызвать внутрибольничные инфекции [1, 3]. Нерациональное же назначение и применение антибиотиков может привести к возникновению новых, более устойчивых штаммов [4]. Данное исследование материала из хирургического, акушерского и гинекологического стационаров, а также из хирургического кабинета поликлиники городской больницы выявило преобладающую роль *Staphylococcus aureus* с высокой степенью резистентности к пенициллинам и значительной долей метициллинрезистентных штаммов. Наибольшую угрозу развития внутрибольничных инфекций в этих подразделениях представляют MRSA, на втором месте – представители группы *Enterobacteriales* (продуцирующие БЛРС), а также полирезистентные *Pseudomonas aeruginosa*, этиологическую роль могут сыграть также ванкомицинрезистентные энтерококки. Поскольку на практике в связи с необходимостью быстрого начала лечения антибактериальная терапия зачастую назначается эмпирически, т.е. до получения результатов бактериологического исследования, важность мониторинга антибиотикорезистентности является очевидной.

Литература

1. Поликарпова СВ, Чепурная ИМ, Жилина СВ, Пивкина НВ, Скала ЛЗ. Анализ микробного пейзажа в современном стационаре. Альманах клинической медицины. 2011;24:61-6.
2. Благодравова АС, Ковалишена ОВ, Алексеева ИГ, Иванова НЮ. Микробиологический пейзаж внешней среды учреждений родовспоможения. Медицинский альманах. 2008;4(5):77-80.
3. Ковалишена ОВ. Роль различных отделений многопрофильного стационара в поддержании эпидемического процесса госпитальных инфекций. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2008;2:498.
4. Стяжкина СН, Кузьяев МВ, Кузьяева ЕМ, Егорова ЭЕ, Акимов АА. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов в клинической больнице. Международный студенческий научный вестник. 2017;1:4.
5. Вильямс Д. Резистентность к бета-лактамам антибиотикам. Антибиотики и химиотерапия. 1997;42(10):5-9.
6. Новый доклад ВОЗ по антибиотикорезистентности. 02.2018 г.
7. Миронова АВ, Коршукова ОА. Факторы вирулентности энтерококков. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2015;2(60):73-78.
8. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М., 2004.
9. Строчунский ЛС, Решедько ГК, Стецюк ОУ, Андреева АС, Щебников АГ; Исследовательская группа РОСНЕТ. Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2003;5:35-46.

References

1. Polikarpova SV, Chepurnaya IM, Zhilina SV, Pivkina NV, Scala LZ. Analysis of the microflora in the modern hospital. Medical Almanac. 2011;24:61-6. (In Russian).
2. Blagonravova AS, Kovalishena OV, Alekseeva IG, Ivanova NY. Microbial landscape of external environment of obstetrics establishments. Medical Almanac. 2008;4(5):77-80. (In Russian).
3. Kovalishena OV. Rol' razlichnykh otdelenii mnogoprofil'nogo stacionara v podderzhanii emidemicheskogo protsessa hospital'nykh infektsii. Vestnik of Russian Military Medical Academy. 2008;2:498. (In Russian).
4. Styazhkina SN, Kuziaev M, Kuzyaeva EM, Egorova EE, Akimov AA. The problem of antibiotic resistance of microorganisms in hospital. Mezhdunarodnyi studencheskii nauchnyi vestnik. 2017;1:4. (In Russian).
5. Vil'yams D. Rezistentnost' k beta-laktamnym antibiotikam. Antibiotics and Chemotherapy. 1997;42(10):5-9. (In Russian).
6. New report WHO on antibiotic resistance. 02.2018. (In Russian).
7. Mironova AV, Korshukova OA. Virulence factors of enterococci. Health. Medical ecology. Science. 2015;2(60):73-78. (In Russian).
8. Methodical instructions of МУК 4.2.1890-04. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Moscow, 2004. (In Russian).
9. Strachunsky LS, Reshedko GK, Stetsyuk OU, Andreeva AS, Tschebnikov AG, Tikhonov YuG, et al. Comparative Activity of Antipseudomonal Antibiotics Against Nosocomial Strains of *P. aeruginosa* in Russian ICUs. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2003;5:35-46. (In Russian).

Оценка эффективности использования УФ-облучателей рециркуляторного типа для обеззараживания воздушной среды в закрытых помещениях

А.В.Загайнова¹, М.А.Сухина², Т.З.Артемova¹, Е.К.Гипп¹, И.В.Курбатова¹,
Т.Н.Максимкина¹, Н.В.Русаков¹, С.А.Фролов², В.Н.Кашников², Д.А.Чистякова²

¹Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сысина
ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация;

²ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

С целью разработки профилактических мероприятий по предотвращению распространения возбудителей воздушно-капельных инфекций бактериальной и грибковой этиологии в закрытых помещениях, в том числе лечебно-профилактических учреждениях, в экспериментальных условиях были проведены исследования по сравнительной оценке эффективности использования трех приборов ультрафиолетовых облучателей-рециркуляторов, рассчитанных на непрерывную работу в присутствии людей. Приборы отличались по мощности и спектру излучения бактерицидных ламп. Принцип работы данных приборов основан на облучении ультрафиолетом прокачиваемого с помощью вентилятора воздуха.

Эффективность обеззараживания воздуха оценивали по общему микробному числу и количеству плесневых грибов в 1 м³. Обсемененность воздуха оценивали во время облучения в аэрогенной камере и закрытых помещениях стационара лечебно-профилактического учреждения в присутствии биообъектов.

Установлено, что облучатель-рециркулятор бактерицидный с мощностью лампы 50W при длине волны излучения 254,7 нм оказался наиболее эффективным по очистке воздуха от бактерий (99,85%/99,83%) и грибов (99,97%/99,72%). Наименее эффективным по очистке воздуха от бактериальной микрофлоры (99,3%/99,71%), грибов (99,2%/99,17%) оказался прибор мощностью лампы 30W с длиной волны излучения 253,4 нм.

Ключевые слова: воздух, эффективность обеззараживания, лечебно-профилактические учреждения, аэрозольная камера, бактерии, грибы

Для цитирования: Загайнова А.В., Сухина М.А., Артемova Т.З., Гипп Е.К., Курбатова И.В., Максимкина Т.Н., Русаков Н.В., Фролов С.А., Кашников В.Н., Чистякова Д.А. Оценка эффективности использования УФ-облучателей рециркуляторного типа для обеззараживания воздушной среды в закрытых помещениях. Бактериология. 2019; 4(1): 21–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-21-27

Evaluation of the effectiveness of the use of recycle-type UV irradiators for disinfecting the air environment in enclosed spaces

A.V.Zagainova¹, M.A.Sukhina², T.Z.Artemova¹, E.K.Gipp¹, I.V.Kurbatova¹,
T.N.Maksimkina¹, N.V.Rusakov¹, S.A.Frolov², V.N.Kashnikov², D.A.Chistyakova²

¹Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health
of the Russian Federation, Research Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene them. A.N.Sysina,
Moscow, Russian Federation;

²State Scientific Center of Coloproctology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Research Institute of
Human Ecology and Environmental Hygiene them. A.N.Sysina, Moscow, Russian Federation

In order to develop preventive measures to prevent the spread of pathogens airborne infections of bacterial and fungal etiology in enclosed areas, including hospitals, in experimental conditions, we compared the efficiency of using three devices of ultraviolet irradiators-recirculators designed for continuous operation in the presence of people. The devices differed in power

Для корреспонденции:

Загайнова Анжелика Владимировна, кандидат биологических наук,
заведующая лабораторией санитарной бактериологии и паразитологии
ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления
медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Адрес: 119992, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1

Телефон: (499) 245-3501

E-mail: angelikaangel@mail.ru

Статья поступила 22.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Angelica V. Zagainova, PhD (Biology), head of the laboratory
of sanitary bacteriology and parasitology, Center for Strategic Planning
and Management of Biological Health Risks of the Ministry
of Health of the Russian Federation

Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russian Federation

Phone: (499) 245-3501

E-mail: angelikaangel@mail.ru

The article was received 22.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

and emission spectrum of germicidal lamps. The principle of operation of these devices is based on ultraviolet irradiation of the air pumped by means of a fan.

The effectiveness of air disinfection was evaluated by the total microbial number and the number of mold fungi in 1 m³. Air contamination was assessed during irradiation in an aerogenic chamber and in an enclosed area of a hospital of a medical institution in the presence of bio-objects.

It has been established that the bactericidal irradiator-recirculator with a lamp power of 50W at an emission wavelength of 254.7 nm turned out to be the most effective in cleaning the air from bacteria (99.85%/99.83%) and fungi (99.97%/99.72%). The least effective in air purification from bacterial microflora (99.3%/99.71%), fungi (99.2%/99.17%) was a device with a lamp power of 30W with an emission wavelength of 253.4 nm.

Keywords: air, decontamination efficiency, hospital, aerosol chamber, bacteria, fungi

For citation: Zagainova A.V., Sukhina M.A., Artemova T.Z., Gipp E.K., Kurbatova I.V., Maksimkina T.N., Rusakov N.V., Frolov S.A., Kashnikov V.N., Chistyakova D.A. Evaluation of the effectiveness of the use of recycle-type UV irradiators for disinfecting the air environment in enclosed spaces. *Bacteriology*. 2019; 4(1): 21–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-21-27

Большую опасность для жизнедеятельности человека и животных представляет микробное загрязнение воздуха закрытых помещений [1–5]. Обеспечение экологической безопасности воздушной среды закрытых помещений является одной из важнейших составных частей экологии человека, поскольку качество жилой среды, в которой человек проводит более 80% своей жизни, является фактором риска в развитии различных заболеваний [6, 7]. Поэтому особый интерес представляют изучение микробного пейзажа воздуха различных закрытых помещений, установление критерия оценки микробного риска здоровью и условия обеззараживания воздуха при различных уровнях микробного загрязнения [8–11]. В настоящее время к числу биологических факторов риска, связанных с воздухом закрытых помещений, можно отнести загрязнение спорами дрожжевых и плесневых грибов, вызывающих аллергию у человека [12–17]. Установлено, что грибы, входящие в состав домашней пыли, могут быть этиологическим фактором аллергических заболеваний [14]. По данным ряда авторов, от 6 до 15% всего населения чувствительны к загрязнению воздушной среды грибами; от 2 до 30% населения имеют аллергопатологию [17–21]. К настоящему времени недостаточно изучены гигиенические аспекты микробной обсемененности воздушной среды закрытых помещений с учетом специфики разных типов жилых зданий, помещений различного назначения, типов строительных и отделочных материалов, микроклиматических параметров внутрижилищной среды [22–24]. Рядом авторов установлена наиболее высокая степень загрязнения воздушной среды споровыми и грампозитивными бактериями, а также плесневыми грибами, принадлежащими к роду *Penicillium* [25–32]. В этой связи вполне обоснована необходимость гигиенической оценки микробной обсемененности воздушной среды закрытых помещений, определения конкретных параметров с целью установления ориентировочно-безопасного уровня контаминации в отношении здоровья человека.

С целью разработки профилактических мероприятий по предотвращению распространения возбудителей воздушно-капельных инфекций бактериальной и грибковой этиологии в закрытых помещениях, особенно в лечебно-профилактических учреждениях, в экспериментальных условиях были проведены исследования эффективности использования УФ-облучателей-рециркуляторов для очистки воздуха закрытых помещений, наиболее часто используемых и в лечебных учреждениях.

В качестве таковых оценивались очистители-рециркуляторы воздуха различных марок, представленных на современном рынке, с учетом их характеристик. Принцип работы данных приборов основан на УФ-обеззараживании прокачиваемого с помощью вентилятора воздуха вдоль бактерицидных УФ-ламп различной мощности и излучении длиной волны от 253,4 до 253,7 нм.

Устройство первого испытуемого прибора рециркулятора воздуха (далее Прибор №1) представлено следующим образом: корпус, образующий камеру облучения, в котором установлены три безозонные бактерицидные лампы мощностью 15W (суммарно 45W) с ультрафиолетовым излучением и длиной волны 253,7нм; колбы ламп выполнены из специального стекла, которое задерживает излучение короче 200 нм, вызывающее образование озона в воздушной среде. Специальное покрытие колб продлевает срок службы ламп до 9000 ч. Продув воздуха через внутренний объем облучателя обеспечивается вентилятором через вентиляционные отверстия (зачерненные жалюзийные решетки V-образного профиля, полностью исключающие попадание УФ-излучения в помещение). В корпусе облучателя бактерицидного установлен экран из алюминиевой фольги с высокой отражающей способностью ультрафиолетового излучения (УФ-излучения). Прибор №1 предназначен для обеззараживания воздуха помещений объемом от 30 м³.

Облучатель-рециркулятор бактерицидный закрытого типа с безозонной бактерицидной лампой для обеззараживания воздуха (далее Прибор №2) предназначен для обеззараживания воздуха помещений объемом до 50 м³ как в присутствии, так и в отсутствие людей. Принцип действия облучателя основан на обеззараживании прокачиваемого воздуха вдоль безозонной бактерицидной лампы низкого давления мощностью 30W, и дающей излучение длиной волны 253,4 нм внутри кожуха облучателя. Корпус облучателя состоит из двух основных частей: основания – отражателя, изготовленного из металла и защитного экрана, выполненного из прозрачного пластика, на внутреннюю поверхность которого нанесен люминофор, преобразующий УФ-излучение бактерицидной лампы в свет. С торцов корпус закрывается крышками с отверстиями, через которые прокачивается воздух, в одной из которых расположен вентилятор. В присутствии людей применение Прибора №2 рассчитано на непрерывную работу в течение 8 ч.

Рециркулятор бактерицидный №3 (далее Прибор №3) предназначен для обеззараживания воздуха помещений

объемом до 170 м³ в присутствии людей за счет воздействия на микроорганизмы бактерицидного УФ-излучения длиной волны 253,7 нм. Укомплектован рециркулятор безозоновой амальгамной азоразрядной бактерицидной лампой низкого давления, электрическая мощность которой составляет 170 Вт, мощность бактерицидного УФ-излучения – 50 Вт в начале срока службы и не менее 40 Вт в конце срока службы. Рециркулятор работает по следующему принципу: воздух из окружающей среды засасывается через входные жалюзи, проходит через зону воздействия УФ-излучением, под действием которого обеззараживается, и удаляется через выходные жалюзи. Для обеспечения движения воздуха используются вентиляторы, а для повышения эффективности использования УФ-излучения часть внутренней поверхности корпуса выполнена как отражатель. Расположенные в корпусе рециркулятора жалюзи и профиль предотвращают выход УФ-излучения наружу. Прибор №3 рассчитан на непрерывную работу в помещении в течение всего рабочего времени.

Согласно паспортам на приборы, все облучатели предназначены для обеззараживания воздуха в помещениях лечебно-профилактических учреждений, спортивных, детских, учебных, производственных, жилых и других зданий в присутствии людей.

Целью исследования явилась сравнительная оценка эффективности обеззараживания воздуха закрытых помещений с помощью трех бактерицидных рециркуляторов с мощностью лампы 45 W и длиной волны 253,7 нм (Прибор №1), с мощностью лампы 30 W и длиной волны 254,3 нм (Прибор №2), с мощностью лампы 50W и длиной волны 253,7 нм (Прибор №3).

Материалы и методы

Определение микробного числа в 1 м³ воздуха является общепринятым показателем в санитарной практике для оценки качества воздуха в отношении микрофлоры различных помещений. В связи с этим проводили оценку общего микробного числа микроорганизмов в воздухе в объеме 1 м³ и количество плесневых и дрожжевых грибов в 1 м³ воздуха.

Работа проводилась в два этапа: экспериментальные исследования в аэрогенной камере и в натуральных условиях в присутствии биообъектов при естественном загрязнении воздуха.

Экспериментальные исследования проводились в аэрогенной камере, которая представляет собой закрытое помещение объемом 27 м³. Искусственную контаминацию воздуха проводили модельными условно-патогенными микроорганизмами *S. aureus* 906 (ГИСК им. Л.А.Тарасевича, г. Москва), *S. epidermidis* (выделенного с кожных покровов человека), *Aspergillus spp.* (выделенного из воздуха жилого помещения). Уровень исходного бактериального загрязнения воздуха составлял 10⁴ КОЕ/м³, а плесневыми грибами – 10⁴ КОЕ/м³.

Пробы воздуха отбирали непосредственно после распыления (контрольный уровень – до включения УФ-лампы) и затем через 15, 30, 60 мин после включения бактерицидных воздухоочистителей.

Контролем служили аналогичные исследования при включении воздухоочистителей.

Натурные исследования проводили в 3 закрытых помещениях стационара лечебно-профилактического учреждения (далее ЛПУ) объемом 30 м³, в каждом из которых находился один из испытуемых бактерицидных облучателей-рециркуляторов (Прибор №1, Прибор №2, Прибор №3). В каждом из помещений имелся естественный фон микробной обсемененности воздуха. Исследования проводились в присутствии человека. Микробную обсемененность воздуха оценивали через 15, 30 и 60 мин работы облучателей-рециркуляторов. В связи с тем, что исследуемые УФ-облучатели рециркуляторного типа предназначены для разных по площади помещений, была выбрана унифицированная площадь в 30 м³ для проведения исследований в натуральных условиях для всех УФ-облучателей.

Отбор проб воздуха производили на уровне 150–160 см от пола аспирационным методом, в соответствии с МУК 4.2.734-99 «Микробиологический мониторинг производственной среды» с помощью метрологически аттестованного прибора для бактериологического анализа воздуха (ПУ-1Б). Пробы воздуха отбирали объемом 100 л для каждого показателя.

Для определения общего содержания микробов в 1 м³ отбор производили на питательный (МПА) и желточно-солевой агары (ЖСА), разлиты в чашки Петри по 24 мл, для определения плесневых и дрожжевых грибов использовали среду Сабуро с хлорамфениколом, также разлитую в чашки Петри.

Посевы на средах МПА и ЖСА инкубировали в термостате при 37°C в течение 48 ч, посевы на среде Сабуро – при двух температурах 22–28°C – 6 сут и 37°C в течение 48 ч, а затем подсчитывали количество выросших колоний в пересчете на 1 м³.

Результаты и обсуждение

В результате проведения экспериментальных исследований в аэрозольной камере были получены следующие результаты. Эффективность работы бактерицидного облучателя-рециркулятора (Прибор №1) в отношении бактериального и грибкового загрязнения составила через 30 мин 96,5% и 93,19%, а через 60 мин – 99,75% и 99,73% соответственно.

В тех же условиях эффективность обеззараживания воздуха Прибором №2 в отношении бактериального и грибкового загрязнения составила через 30 мин 93,00% и 92,0%, а через 60 мин – 99,3% и 99,2 % соответственно.

Эффективность обеззараживания Прибора №3 оказалась намного выше как в отношении бактериального, так и в отношении грибкового загрязнения и составила через 30 мин 95,5% и 94,58%, а через 60 мин – 99,85% и 99,83% соответственно (табл. 1).

Полученные данные при искусственном обсеменении воздуха бактериальной и грибковой микрофлорой, представленные в таблице 1, свидетельствуют о зависимости обеззараживающего эффекта испытуемых приборов от времени обработки, мощности и длины волны бактерицидной лампы.

Таблица 1. Оценка эффективности очистки воздуха от загрязнения бактериями и грибами, при искусственном его обсеменении (экспериментальные исследования)

Продолжительность работы	Эффективность обеззараживания воздуха при искусственном обсеменении воздуха бактериями и грибами			
Контроль	ОМЧ*, КОЕ/м ³	Эффективность очистки, в %	Грибы, КОЕ/м ³	Эффективность очистки, в %
<i>Облучатель-рециркулятор бактерицидный Прибор №1</i>				
Контроль (до включения прибора)	2,0 × 10 ⁴	–	2,2 × 10 ⁴	–
15 минут	1,4 × 10 ⁴	30,0	1,7 × 10 ⁴	22,73
30 минут	0,7 × 10 ³	96,5	1,5 × 10 ³	93,19
60 минут	0,5 × 10 ²	99,75	0,6 × 10 ²	99,73
<i>Облучатель-рециркулятор бактерицидный Прибор №2</i>				
Контроль (до включения прибора)	1,0 × 10 ⁴	–	1,0 × 10 ⁴	–
15 минут	0,8 × 10 ⁴	20,0	8,3 × 10 ⁴	17,8
30 минут	0,7 × 10 ³	93,0	0,8 × 10 ³	92,0
60 минут	0,7 × 10 ²	99,3	0,8 × 10 ²	99,2
<i>Облучатель-рециркулятор бактерицидный Прибор №3</i>				
Контроль (до включения прибора)	2,0 × 10 ⁴	–	2,4 × 10 ⁴	–
15 минут	1,7 × 10 ⁴	15	1,8 × 10 ⁴	25,0
30 минут	0,9 × 10 ³	95,5	1,3 × 10 ³	94,58
60 минут	0,3 × 10 ²	99,85	0,4 × 10 ²	99,83

*ОМЧ – общее микробное число.

Таблица 2. Оценка эффективности очистки воздуха от бактерий и грибов, при естественной его обсемененности (натурные исследования)

Продолжительность работы	Эффективность обеззараживания воздуха при искусственном обсеменении воздуха бактериями и грибами			
Контроль	ОМЧ*, КОЕ/м ³	Эффективность очистки, в %	ОГО**, КОЕ/м ³	Эффективность очистки, в %
<i>Облучатель-рециркулятор бактерицидный марки Прибор №1</i>				
Контроль (до включения прибора)	2,8 × 10 ³	–	3,6 × 10 ²	–
15 минут	1,7 × 10 ³	39,29	2,9 × 10 ²	19,44
30 минут	0,9 × 10 ³	67,86	1,1 × 10 ²	69,44
60 минут	4	99,86	2	99,44
<i>Облучатель-рециркулятор бактерицидный марки Прибор №2</i>				
Контроль (до включения прибора)	6,6 × 10 ³	–	3,6 × 10 ²	–
15 минут	3,9 × 10 ³	40,9	2,5 × 10 ²	30,56
30 минут	2,8 × 10 ³	57,58	1,2 × 10 ²	66,67
60 минут	1,9 × 10 ¹	99,71	0,3 × 10 ¹	99,17
<i>Облучатель-рециркулятор бактерицидный Прибор №3</i>				
Контроль (до включения прибора)	3,5 × 10 ³	–	3,5 × 10 ²	–
15 минут	2,5 × 10 ³	25,57	2,7 × 10 ³	22,86
30 минут	0,1 × 10 ³	71,43	1,0 × 10 ³	71,43
60 минут	1	99,97	1	99,72

*ОМЧ – общее микробное число; **ОГО – общая грибная обсемененность.

В натуральных условиях было установлено, что через 30 мин работы Прибора №1 воздух в помещении очищался на 67,86% от бактерий и на 69,44% от грибов; через 60 мин – соответственно на 99,86% и 99,44%. Эффективность обеззараживания воздуха Прибором №2 составила через 30 мин 57,58% в отношении бактерий и 66,67% в отношении грибов; через 60 мин – 99,71% и 99,17% соответственно. При оценке эффективности обеззараживания воздуха Прибором №3 эффективность обеззараживания воздуха составила через 30 мин 71,43% от бактериальной и грибковой микрофлоры, а через 60 минут – 99,97% и 99,71% соответственно (табл. 2).

Полученные данные при естественном обсеменении воздуха бактериями и грибами, представленные в таблице 2, свидетельствуют также о наличии зависимости обеззараживающего эффекта испытуемых приборов от времени обработки помещения, мощности и длины волны бактерицидной лампы.

В результате сравнительной оценки обеззараживающего воздействия воздухоочистителей облучателей-рециркуляторов бактерицидных: Прибора №1, Прибора №2, Прибора №3 было установлено, что наиболее стабильным и эффективным по очистке воздуха от бактерий и грибов можно признать воздухоочиститель рециркулятор бактерицидный Прибора №3, в результате работы которого через 60 мин (как в экспериментальных, так и в натуральных условиях) получена самая высокая среди исследованных приборов степень обеззараживания воздуха, что соответствовало в отношении бактериального загрязнения заявленным параметрам прибора ≈99,9%. Причем при высоком уровне бактериального загрязнения воздуха в помещении в экспериментальных условиях – $n \times 10^4$ КОЕ/м³ эффективность обеззараживания (99,85%) была меньше по сравнению с загрязнением в естественных условиях – $n \times 10^3$ КОЕ/м³ (99,97%). В отно-

шении грибов такой закономерности для прибора №3 не установлено, так как при уровне загрязнения $n \times 10^4$ плесневых грибов в 1 м³ эффективность обеззараживания воздуха составила 99,83%, а при $n \times 10^2$ плесневых грибов в 1 м³ – 99,72%, что говорит о большей устойчивости грибов в помещениях ЛПУ к УФ-обеззараживанию и необходимости увеличения времени обработки помещений.

У Прибора №1 эффективность обеззараживающего воздействия на бактериальную микрофлору как в экспериментальных, так и в натуральных исследованиях была достаточно высокой (99,75–99,76%). Однако эффект воздействия на грибы был ниже – 99,73–99,44%, особенно в естественных условиях, что тоже говорит о большей устойчивости грибов в помещениях ЛПУ к УФ-обеззараживанию и увеличению времени обработки помещений.

Наименее эффективен оказался воздухоочиститель облучатель-рециркулятор бактерицидный Прибор №2, так как обеззараживающий эффект в отношении бактериальной микрофлоры и грибов через 60 мин работы прибора при высоком уровне загрязнения воздуха в экспериментальных условиях составил 99,3% для бактериальной микрофлоры и 99,2 % грибов, а при естественном (сниженном) уровне – 99,71% в отношении бактерий и 99,17% в отношении грибов, с той же тенденцией в отношении загрязнения воздуха грибами в помещениях ЛПУ, что и у первых двух приборов.

Заключение

Таким образом, проведена сравнительная оценка эффективности использования трех приборов УФ-облучателей рециркуляторного типа, рассчитанных на непрерывную работу в присутствии людей, отличающихся между собой мощностью бактерицидных ламп и длиной волны (прибор №1 – 45W, 254,7 нм, прибор №2 – 30W, 253,4 нм, прибор №3 –

50W 254,7 нм), основанных на УФ-обеззараживании прокачиваемого с помощью вентилятора воздуха вдоль бактерицидных УФ-ламп, показавшая, что эффективнее в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры оказался Прибор №3 с характеристиками по эффективности обеззараживания воздуха в отношении бактериальной микрофлоры, соответствующими заявленным производителем. Через 60 мин работы Прибора №3 содержание бактериальной микрофлоры и грибов снизилось на два порядка в экспериментальных условиях с высоким уровнем загрязнения воздуха и до единичных клеток – в естественных условиях помещений ЛПУ с низким загрязнением. При этом эффективность обеззараживания составила в отношении бактериального загрязнения 99,85–99,97% соответственно, а в отношении загрязнения грибами – 99,83–99,72%.

Облучатель-рециркулятор бактерицидный Прибора №1, имеющего мощность бактерицидной лампы 45W и длину волны 254,7 нм, рассчитанный на обработку помещений от 30 м³, показал в результате проведенных экспериментальных исследований эффективность обеззараживающего воздействия на бактериальную микрофлору и грибы в экспериментальных условиях с высоким уровнем загрязнения воздуха соответственно 99,7% и 99,73%, при этом число клеток снижалось на два порядка. В естественных условиях помещений ЛПУ с низким уровнем загрязнения воздуха число бактериальных клеток и спор грибов после 60 мин работы Прибора №2 снизилось до единичных. При этом его эффективность составила 99,86% в отношении бактерий и 99,44% – в отношении грибов.

Наименее эффективным по очистке воздуха от бактериальной микрофлоры и грибов оказался прибор №2 облучатель-рециркулятор бактерицидный, имеющий мощность бактерицидной лампы 30W и длину волны 253,4 нм, рассчитанный на обработку помещений от 50 м³, т.к. обеззараживающая эффективность в отношении бактерий и грибов, достигнутая через 60 мин, составила 99,3–99,2% (в экспериментальных условиях) и 99,71–99,17% (в условиях естественного загрязнения воздуха) соответственно. При этом число бактерий и плесневых грибов при высоком уровне загрязнения снизилось на два порядка, а при низком уровне загрязнения воздуха – до десятков клеток в 1 м³, что не соответствовало заявленным в паспорте к прибору параметрам в отношении бактериального загрязнения.

В связи с тем, что во всех исследуемых приборах изготовители рассматривают эффективность обеззараживания воздуха только в отношении бактериальной микрофлоры, ориентируясь на условно-патогенные бактерии *S. aureus*, наша задача заключалась в оценке эффективности приборов в отношении не только заявленных маркерах загрязнения воздуха, но и в отношении загрязнения помещения грибами. В результате проведенных исследований установлено, что при оценке эффективности обеззараживания воздуха в отношении грибов у трех приборов в экспериментальных условиях с высоким уровнем загрязнения плесневым грибом *Aspergillus sp.*, выделенным из воздуха жилого помещения, количество грибов в воздухе снижалось на два порядка. При оценке обеззараживающего действия УФ-облучателей рециркуляторного типа в помещениях ЛПУ количество плесневых грибов снижалось до десятков и единич-

ных клеток, что говорит о большей устойчивости грибов в помещениях лечебно-профилактических учреждений к УФ-обеззараживанию и необходимости более длительного по времени режиму обеззараживания воздуха. Эффективность обеззараживания УФ-облучателями рециркуляционного типа различных помещений находится в прямой зависимости от времени обработки и площади помещения, мощности и длины волны бактерицидной лампы облучателя.

Литература

1. Methling W. Vorkommen und qualitative Eigenschaften von Staph, Aureus, E. coli und Enterokokken in der Luft von Schweinezuchtställen. Proceedings of the 5th International congress on animal hygiene. Hannover, 1985, pp. 247-251.
2. Pickrell J. Hazards in confinement housing gases and dusts in confined animal houses for swine, poultry, horses and humans. Vet Hum Toxicol. 1991 Feb; 33(1):32-9.
3. Фотина ТИ, Зон ГА. Качественный состав микрофлоры воздуха индейководческих помещений. Вклад молодых ученых Украины в интенсификацию сельскохозяйственного производства, 1987, с. 161.
4. Шакарян ГА, Акопян М, Севян ТК. Результаты бактериологических исследований воздуха некоторых животноводческих помещений. Сб. науч. тр. Ерев. зоовет. инст-та. Т. 60. 1987, с. 103-107.
5. Шведов В. Индекс свежести воздушной среды. Коневодство и конный спорт. 1992; 4:23.
6. Гущин ИС, Ильина НИ, Польшнер СА. Аллергический ринит. Пособие для врачей. М., 2002, 68 с.
7. Блинов НП, Васильева НВ. Микромицеты аллергены. «Булатовские чтения». Тезисы докладов Научно-практической конференции «Актуальные вопросы пульмонологии и клинической аллергологии. СПб., 1999, с. 34.
8. Akiyama K. The role of fungal allergy in bronchial asthma. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2000;41(3):149-55.
9. Peat JK, Dickerson J, Li J. Effects of damp and mould in the home on respiratory health, a review of the literature. Allergy. 1998 Feb; 53(2):120-8.
10. Peat J, Tovey E, Toelle BG, Haby MM, Gray EJ, Mahmic A, Woolcock AJ. House dust mite allergens: a major risk factor for childhood asthma in Australia. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Jan; 153(1):141-6.
11. Piatt SD, Martin CJ, Hunt SM, Lewis CW. Damp housing, mould growth and health state. BMJ. 1989 Jun 24;298(6689):1673-8.
12. Адо ВА, Зяблова НМ, Ирошников ЕС. Экология и аллергия. Воронеж: Издательство Воронежского университета; 1992, 111 с.
13. Адо АД. Экология и аллергология. Клиническая медицина. 1990;68(9):3-6.
14. Ильина НИ. Эпидемиология аллергического ринита. Российская ринология. 1999;1:23-5.
15. Скепьян НА. Аллергические болезни. Дифференциальный диагноз, лечение. Беларусь, 2000, с. 43-50, 228-232.
16. Соболев АВ. Аллергические заболевания органов дыхания, вызываемые грибами. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. СПб., 1997, 41 с.
17. Балаболкин ИИ, Ефимова АА. Влияние экологического неблагополучия на распространенность болезней органов дыхания. В кн.: Экология и здоровье детей. М.: Медицина; 1998, с. 188-205.
18. Балаболкин ИИ, Ключев БВ, Ботвиньева ВВ, и др. Клинические и иммунологические проявления бронхиальной астмы у детей с сенсибилизацией к плесневым грибам. Педиатрия. 1993;3:21-23.
19. Блинов НП. Медицинская микология. В кн.: Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина; 1994, с. 441-466.
20. Etzel R, Rylander R. Indoor mold and children's health. Environ Health Perspect. 1999 Jun; 107 Suppl 3:463.

21. Madelin TM, Madelin MF. Biological analysis of fungi and associated molds. In: C.S.Cox and C.M.Wathes (ed.). Bioaerosol handbook. Lewis Publ. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.; 1995. P. 361-386.
22. Беляева НН, Кутепов ЕН, Шамарин АА. Гигиеническая оценка состояния окружающей среды и здоровья населения в г. Москве. М.; 1997, с. 45-48.
23. Gaüzère C, Godon JJ, Blanquart H, Ferreira S, Moularat S, Robine E, Moletta-Denat M. Core species' in three sources of indoor air belonging to the human micro-environment to the exclusion of outdoor air. 2014 Jul 1;485-486:508-517. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.117
24. Ryan TJ, Beaucham C. Dominant microbial volatile organic compounds in 23 US homes. 2013 Jan;90(3):977-85. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.066. Epub 2012 Aug 11.
25. Антропова АБ, Биланенко ЕН, Мокеева ВЛ, Чекунова ЛН, Петрова-Никитина АД, Желтикова ТМ. Микобиота жилых помещений г. Москвы. Тезисы сообщений на VII Кашкинских чтениях. Проблемы медицинской микологии. 2004;6(2):58.
26. Антропова АБ, и др. Аэромикота жилых помещений г. Москвы. Микология и фитопатология. 2003;37(6):9-11.
27. Хаитов РМ, Игнатъева ГА, Сидорович ИГ. Иммунология. М.: Медицина; 2000, 429 с.
28. Dzidzio LK, Bush RK. Assessment and control of fungal allergen. Current allergy and asthma reports. Curr Allergy Asthma Rep. 2001 Sep;1(5):455-60.
29. Hirsch SR, Sosman JA. A one-year survey of mould growth inside twelve homes. Ann Allergy. 1976 Jan;36(1):30-8.
30. Mailing HL. Diagnosis and immunotherapy of mold allergy with special reference to *Cladisporium herbarum*. Dan Med Bull. 1990 Feb;37(1):12-22.
31. Ponsonby AZ, Couper D, Dwyer T, Carmichael A, Kemp A, Cochran J. The relation between fungant indoor environment and subsequent asthma. Epidemiology. 2000 Mar;11(2):128-35.
32. Ramirez C. Manual and atlas the Penicillia. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Biomedical Press; 1982, 874 p.
11. Piatt SD, Martin CJ, Hunt SM, Lewis CW. Damp housing, mould growth and health state. BMJ. 1989 Jun 24;298(6689):1673-8.
12. Ado VA, Zyblova NM, Iroshnikova ES. Ekologiya i allergiya [Ecology and Allergy]. Voronezh: Voronezh University Press; 1992, 111 p.
13. Ado AB. Ecology and Allergy. Clinical Medicine (Klinicheskaya Meditsina). 1990;68(9):3-6.
14. Il'ina NI. Epidemiology of allergic rhinitis. Rossiyskaya Rinologiya (Russian Rhinology). 1999;1:23-5.
15. Skepian HA. Allergicheskie bolezni. Differentsial'nyi diagnost, lechenie [Allergic diseases. Differential diagnosis, treatment]. Belarus, 2000, pp. 43-50, 228-232.
16. Sobolev AB. Allergic diseases of the respiratory system caused by fungi. Diss. St. Petersburg, 1997, 41 p.
17. Balabolkin II, Efimova AA. Vliyanie ekologicheskogo neblagopoluchiya na rasprostranennost' boleznei organov dykhaniya [The impact of environmental problems on the prevalence of respiratory diseases]. In: Ekologiya i zdorov'e detei [Ecology and Children's Health]. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1998, pp. 188-205.
18. Balabolkin II, Klyuev BV, Botvineva VV, et al. Clinical and immunological manifestations of asthma in children with sensitization to mold fungi. Peditriia. Journal named after G.N.Speransky. 1993;3:21-3.
19. Blinov NP. Meditsinskaya mikologiya [Medical mycology]. In: Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya [Medical microbiology, virology and immunology]. Edited by L.B.Borisov, A.M.Smirnova. Moscow: Meditsina Publ.; 1994, pp. 441-466.
20. Etzel R, Rylander R. Indoor mold and children's health. Environ Health Perspect. 1999 Jun; 107 Suppl 3:463.
21. Madelin TM, Madelin MF. Biological analysis of fungi and associated molds. In: C.S.Cox and C.M.Wathes (ed.), Bioaerosol handbook. Lewis Publ. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.; 1995. P. 361-386.
22. Belyaeva HH, Kutepov EH, Shamarin AA. Gigienicheskaya otsenka sostoyaniya okruzhayushchei sredy i zdorov'ya naseleniya v g. Moskve [Hygienic evaluation of environmental and public health in Moscow]. Moscow; 1997, pp. 45-48.
23. Gaüzère C, Godon JJ, Blanquart H, Ferreira S, Moularat S, Robine E, Moletta-Denat M. Core species' in three sources of indoor air belonging to the human micro-environment to the exclusion of outdoor air. 2014 Jul 1;485-486:508-517. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.117
24. Ryan TJ, Beaucham C. Dominant microbial volatile organic compounds in 23 US homes. 2013 Jan;90(3):977-85. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.066. Epub 2012 Aug 11.
25. Antropova AB, Bilanenko EH, Mokeeva VL, Chekunova LN, Petrova-Nikitina AD, Zheltikova TM. Mycobiota dwellings in the city of Moscow. Abstracts of messages at the VII Kashkinsky readings. Problems in Medical Mycology. 2004; 6(2):58.
26. Antropova AB, Mokeeva VL, Bilanenko EN, Chekunova LN, Zheltikova TM, Petrova-Nikitina AD. Aeromycota of Moscow dwellings. Mycology and Phytopathology. 2003;37(6):9-11.
27. Khaitov PM, Ignat'eva GA, Sidorovich IG. Immunologiya [Immunology]. Moscow: Meditsina Publ.; 2000, 429 p.
28. Dzidzio LK, Bush RK. Assessment and control of fungal allergen. Current allergy and asthma reports. Curr Allergy Asthma Rep. 2001 Sep;1(5):455-60.
29. Hirsch SR, Sosman JA. A one-year survey of mould growth inside twelve homes. Ann Allergy. 1976 Jan;36(1):30-8.
30. Mailing HL. Diagnosis and immunotherapy of mold allergy with special reference to *Cladisporium herbarum*. Dan Med Bull. 1990 Feb;37(1):12-22.
31. Ponsonby AZ, Couper D, Dwyer T, Carmichael A, Kemp A, Cochran J. The relation between fungant indoor environment and subsequent asthma. Epidemiology. 2000 Mar;11(2):128-35.
32. Ramirez C. Manual and atlas the Penicillia. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Biomedical Press; 1982, 874 p.

References

1. Methling W. Vorkommen und qualitative Eigenschaften von Staph, Aureus, E. coli und Enterokokken in der Luft von Schweinezuchtställen. Proceedings of the 5th International congress on animal hygiene. Hannover, 1985, pp. 247-251.
2. Pickrell J. Hazards in confinement housing gases and dusts in confined animal houses for swine, poultry, horses and humans. Vet Hum Toxicol. 1991 Feb; 33(1):32-9.
3. Fotina TI, Zon GA. Qualitative composition of microflora of air in indoor areas. Proceedings of scientists of Ukraine in the intensification of agricultural production, 1987, p. 161.
4. Shakaryan GA, Akopyan M, Sevyan TK. Results of bacteriological studies of the air by some livestock buildings. Proceedings. Vol. 60. 1987, pp. 103-107.
5. Shvedov V. Index of freshness of the air environment. Konevodstvo I Konny Sport. 1992;4:23.
6. Gushchin IS, Il'ina NI, Pol'ner SA. Allergicheskiy rinit [Allergic rhinitis]. Moscow, 2002, 68 p.
7. Blinov NP, Vasil'eva NV. Micromycetes allergens. "Bulatov reading". Proceedings of Scientific-Practical Conference «Topical issues of pulmonology and clinical allergology». St. Petersburg, 1999, p. 34.
8. Akiyama K. The role of fungal allergy in bronchial asthma. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2000;41(3):149-55.
9. Peat JK, Dickerson J, Li J. Effects of damp and mould in the home on respiratory health, a review of the literature. Allergy. 1998 Feb; 53(2):120-8.
10. Peat J, Tovey E, Toelle BG, Haby MM, Gray EJ, Mahmic A, Woolcock AJ. House dust mite allergens: a major risk factor for childhood asthma in Australia. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Jan; 153(1):141-6.

Информация об авторах:

Сухина Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 123423, Москва, ул. Салаяма Адила, 2
Телефон: (499) 199-8444
E-mail: marinasukhina@rambler.ru

Артемова Тамара Захаровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории санитарной бактериологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 119992, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1
Телефон: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Гипп Евгения Константиновна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории санитарной бактериологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 119992, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1
Телефон: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Курбатова Ирина Валентиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории санитарной бактериологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 119992, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1
Телефон: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Максимкина Татьяна Николаевна, научный сотрудник лаборатории санитарной атмосферного воздуха с группой жилых и общественных зданий ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 119992, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1
Телефон: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Русаков Николай Васильевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 119992, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1
Телефон: (499) 246-5824
E-mail: info@sysin.ru

Фролов Сергей Алексеевич, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 123423, Москва, ул. Салаяма Адила, 2
Телефон: (499) 642-5440
E-mail: info@gnck.ru

Кашников Владимир Николаевич, доктор медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 123423, Москва, ул. Салаяма Адила, 2
Телефон: (499) 642-5440
E-mail: info@gnck.ru

Чистякова Дарья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 123423, Москва, ул. Салаяма Адила, 2
Телефон: (499) 199-8444

Information about authors:

Marina A. Sukhina, PhD (Biology), head of the department of microbiological and immunological research, State Scientific Center of Coloproctology, of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 2 Salam Adilya str., Moscow, 123423, Russian Federation
Phone: (499) 199-8444
E-mail: marinasukhina@rambler.ru

Tamara Z. Artemova, PhD (Biology), leading researcher, laboratory of sanitary bacteriology and parasitology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russian Federation
Phone: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Evgenia K. Gipp, MD, PhD, senior researcher, laboratory of sanitary bacteriology and parasitology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russian Federation
Phone: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Irina V. Kurbatova, PhD (Biology), senior researcher, laboratory of sanitary bacteriology and parasitology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russian Federation
Phone: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Tatyana N. Maksimkina, researcher, laboratory of sanitary bacteriology and parasitology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russian Federation
Phone: (499) 245-3501
E-mail: milkbacterialab@list.ru

Nikolay V. Rusakov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor, chief researcher, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of Russian Federation
Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russian Federation
Phone: (499) 246-5824
E-mail: info@sysin.ru

Sergey A. Frolov, MD, PhD, DSc, deputy director for Science, State Scientific Center of Coloproctology, of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 2 Salam Adilya str., Moscow, 123423, Russian Federation
Phone: (499) 642-5440
E-mail: info@gnck.ru

Vladimir N. Kashnikov, MD, PhD, DSc, deputy director for clinical work, State Scientific Center of Coloproctology, of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 2 Salam Adilya str., Moscow, 123423, Russian Federation
Phone: (499) 642-5440
E-mail: info@gnck.ru

Daria A. Chistyakova, junior researcher of microbiological and immunological research, State Scientific Center of Coloproctology, of the Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 2 Salam Adilya str., Moscow, 123423, Russian Federation
Phone: (499) 199-8444

Обучение регламентированным методам лабораторной диагностики холеры с использованием набора учебных штаммов

Е.В.Растунцева, Л.А.Тихомирова, Ю.А.Попов

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Разработаны критерии для подбора учебных штаммов холерного вибриона и других микроорганизмов в соответствии с современными алгоритмами и методами лабораторной диагностики холеры. Сформирован набор учебных штаммов бактерий для обучения специалистов вопросам микробиологии и лабораторной диагностики холеры на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации, что позволяет освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики холеры, снизить вероятность лабораторного инфицирования возбудителем холеры обучающихся на практических занятиях, а также приобрести навыки работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с патогенными биологическими агентами.

Ключевые слова: программы дополнительного профессионального образования, лабораторная диагностика холеры, набор учебных штаммов, биологическая безопасность

Для цитирования: Растунцева Е.В., Тихомирова Л.А., Попов Ю.А. Обучение регламентированным методам лабораторной диагностики холеры с использованием набора учебных штаммов. Бактериология. 2019; 4(1): 28–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-28-33

Training in regimented methods of laboratory cholera diagnostics using the panel of practice educational strains

E.V.Rastuntseva, L.A.Tikhomirova, Yu.A.Popov

RusRAPI «Microbe» of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Designed have been the criteria for the selection of training cholera vibrio and other microorganism strains in accordance with modern algorithms and techniques of laboratory cholera diagnostics. The panel of educational bacterial strains for training the specialists in the sphere of microbiology and laboratory cholera diagnostics in the professional retraining and advanced vocational courses has been put together. It provides for full exploration of regimented methods of laboratory cholera diagnostics, decrease in the probability of laboratory infection with cholera in the practice classes, as well as acquiring the skills needed for work with cholera agent in accordance with normative regulations on the safe operation with pathogenic biological agents.

Keywords: syllabus and programs of further vocational education, laboratory cholera diagnostics, panel of training strains, biological safety

For citation: Rastuntseva E.V., Tikhomirova L.A., Popov Yu.A. Training in regimented methods of laboratory cholera diagnostics using the panel of practice educational strains. Bacteriology. 2019; 4(1): 28–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-28-33

Холера остается актуальным для мирового здравоохранения инфекционным заболеванием. Заболеваемость холерой регистрируется в существующих очагах инфекции в Азии, Африке, странах Карибского бассейна; в 2017 г. сформировались новые эндемичные территории в странах Африканского континента (Кения, Танзания, Малави, Демократическая Республика Конго, Южный Судан). С 2008 по 2017 гг. в мире зарегистрировано около 2,5 млн больных в разных странах, что указывает на продолжающееся,

характерное для пандемии, распространение холеры с вовлечением новых территорий и делает прогноз по холере неблагоприятным [1]. Рост миграционных потоков иностранных граждан и соотечественников усугубляет возможность завоза холеры на территорию Российской Федерации [1, 2]. Возможным риском заноса возбудителя холеры могут служить контаминированные холерными вибрионами балластные воды судов и формирующиеся на разнообразных плотных поверхностях биопленки [3]. Помимо занесен-

Для корреспонденции:

Растунцева Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон (8452) 51-5230

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 25.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Elena V. Rastuntseva, MD, PhD, senior researcher of the department of educational programs and training of specialists, RusRAPI «Microbe» of the Rosпотребнадзор

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

Phone: (8452) 51-5230

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 25.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

ных из эндемичных по холере регионов токсигенных штаммов возбудителя холеры, на территории РФ ежегодно от людей и из поверхностных водоемов выделяют большое количество нетоксигенных штаммов холерного вибриона, которые могут служить причиной острых кишечных инфекций. Исследователями выявлена группа нетоксигенных штаммов холерного вибриона, представляющая эпидемиологическую опасность в связи с возможностью их реверсии в токсигенные путем фаговой конверсии [4].

Все перечисленное делает необходимым совершенствование системы эпидемиологического надзора, одной из важных составляющих которого является подготовка специалистов для обеспечения комплекса мероприятий по диагностике и профилактике холеры [5, 6].

На базе отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора реализуется многоуровневая система обучения эпидемиологическому надзору и лабораторной диагностике холеры специалистов Роспотребнадзора – противочумных институтов и станций, Центров гигиены и эпидемиологии, Управлений Роспотребнадзора, а также различных медицинских учреждений: больниц, поликлиник, учреждений Министерства обороны РФ. Для этого составлены специальные программы тематических курсов повышения квалификации по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой (продолжительностью 36 и 72 ч), ежегодно проводятся семинары по данной тематике, в программу которых включают актуальные вопросы. На протяжении нескольких лет сотрудники института проводят обучение специалистов Республики Гвинея, ряда стран СНГ по программам повышения квалификации «Борьба с опасными инфекционными болезнями. Современные методы лабораторной диагностики», «Санитарная охрана территорий государств, лабораторная диагностика инфекционных болезней, биологическая безопасность, информационные технологии» и другим, где освещаются вопросы эпиднадзора, микробиологии и лабораторной диагностики холеры.

Модуль «Микробиология и лабораторная диагностика холеры», включающий теоретические и практические занятия, является одним из основных разделов программ дополнительного профессионального образования специалистов, работающих с возбудителями особо опасных инфекционных болезней: профессиональной переподготовки врачей и биологов, лаборантов по профилям «Бактериология», «Эпидемиология», «Лабораторное дело» с основами безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп; программ повышения квалификации «Бактериология», «Эпидемиология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации», «Особо опасные инфекции», «Подготовка личного состава специализированных противоэпидемических бригад для работы в чрезвычайных ситуациях» и других.

Для проведения практических занятий по освоению регламентированных методов диагностики холеры традиционно используют штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биоваров классического и Эль Тор, *Vibrio cholerae* O139 серогруппы II группы патогенности. Актуальным и приоритетным направлением снижения риска обучающих технологий является замена вирулентных штаммов на авирулентные или на

штаммы с более низкой вирулентностью при условии выполнения учебного плана в полном объеме и приобретения навыков работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с ПБА [7, 8].

Нами были разработаны технические задания и критерии подбора учебных штаммов возбудителей холеры в соответствии с современными алгоритмами и методами лабораторной диагностики холеры, учебно-тематическими планами программ подготовки специалистов и результатами обучения (знания, умения, навыки).

Критериями отбора штаммов холерного вибриона в качестве учебных послужили авирулентность или низкая вирулентность, типичные для *V. cholerae* биологические, культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства, позволяющие изучить морфологию клеток в мазках, характер роста на плотных и жидких питательных средах, а также биологические особенности представителей различных серогрупп, сероваров и биоваров классического и Эль Тор и методы их дифференциации.

Учебные штаммы *V. cholerae* должны обладать комплексом свойств, необходимых для проведения индикации, идентификации и внутривидовой и межвидовой дифференциации возбудителя холеры регламентированными методами исследования: бактериоскопическим, бактериологическим, иммунологическим и молекулярно-генетическим [9], чувствительностью к антибактериальным препаратам, используемым для специфической профилактики холеры.

Анализ доступных нам информационных источников – литературы, патентов и других выявил отсутствие штаммов *Vibrio cholerae*, используемых для обучения регламентированным методам лабораторной диагностики холеры.

Цель исследования: формирование набора учебных штаммов бактерий для совершенствования методического обеспечения и снижения биологических рисков при подготовке специалистов по вопросам микробиологии и лабораторной диагностики холеры.

Предлагаемый набор учебных штаммов для обучения бактериологическому методу диагностики холеры должен включать представителей следующих групп микроорганизмов.

1) Холерных вибрионов различных серологических групп, биовариантов и серовариантов – как *Vibrio cholerae classical* и *Vibrio cholerae El Tor* O1 серогруппы, так и *Vibrio cholerae* серогруппы O139, обладающих типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами, стабильным антигенным строением.

2) Возбудителей гастроэнтеритов и системных инфекций – *Vibrio cholerae non O1/O139*.

3) Галофильных вибрионов, вызывающих заболевания у человека с явлениями гастроэнтерита, – *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*; вибрионов, выделяющихся из поверхностных водоемов и морей, – *V. phosphorescens (albensis)*.

4) Возбудителей острых кишечных инфекций у человека – представителей родов *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*.

5) Микроорганизмов, вызывающих системные инфекции у человека и выделяющихся из клинического материала и объектов окружающей среды, относящихся к роду *Pseudomonas*.

6) Возбудителя острых токсикоинфекций у человека – *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биоваров классического и Эль Тор, *Vibrio cholerae* серогруппы O139 (II группа патогенности), *Vibrio cholerae* non O1/O139 (III группа патогенности), штаммы других представителей рода *Vibrio* – *V. albensis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* (IV группа патогенности), штаммы микроорганизмов родов *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*; штаммы *Staphylococcus aureus* (III–IV группы патогенности). Штаммы бактерий отобраны из числа хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») на основании паспортных данных с учетом разработанных нами критериев.

Культуры вышеперечисленных микроорганизмов выращивали на агаре и бульоне Хоттингера pH 7,6 при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Дополнительно штаммы родов *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* засеивали на среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар, Симмонса; для изучения свойств *Staphylococcus aureus* делали посеvy данной культуры на агар и бульон Хоттингера pH 7,4, агар Хоттингера pH 7,4 с добавлением 3–5% крови барана, желточно-солевой агар, для определения плазмокоагулазы – в пробирки с плазмой кролика (1:5) по 0,5 мл.

Морфологию клеток исследуемых культур изучали в мазках, окрашенных по Граму, путем просмотра под увеличением $\times 400$ – 600 в световом микроскопе Микмед-5 («ЛОМО», Санкт-Петербург). Колонии просматривали под малым увеличением светового микроскопа, а также с использованием устройства для просмотра колоний в косопадающем свете под углом 45° . Подвижность микроорганизмов определяли методами висячей и раздавленной капли при просмотре под увеличением $\times 400$ – 600 светового микроскопа и посевом в столбик 0,3% агара Хоттингера. Биохимические, биологические, антигенные свойства, чувствительность к бактериофагам изучали с помощью стандартных методов, регламентированных при лабораторной диагностике холеры. Для постановки методов специфической индикации (МФА) использовали иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные O1 и O139 и люминесцентный микроскоп Nikon с возможностями документирования изображений Eclipse 80i (Япония). Вирулентность и генетические характеристики штаммов *Vibrio cholerae* оценивали согласно паспортным данным.

Результаты и обсуждение

По наличию фенотипических признаков, свойственных возбудителю холеры, было отобрано 19 штаммов *V. cholerae*: 2 штамма *Vibrio cholerae cholerae*, 12 штаммов *Vibrio cholerae El Tor* сероваров Огава и Инаба, 3 штамма *Vibrio cholerae* O139 и 2 штамма *Vibrio cholerae* non O1/O139.

Для освоения принципов и методов дифференциальной диагностики с возбудителем холеры отобраны 5 штаммов других представителей рода *Vibrio*, 6 штаммов бактерий, принадлежащих к родам *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, 6 штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* родов *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*; 2 штамма возбудителя острых токсикоинфекций у человека – *Staphylococcus aureus*.

Проведен анализ фенотипических (морфологических, культуральных, биохимических, антигенных) свойств выбранных штаммов микроорганизмов, являющихся основой для регламентированных методов индикации и идентификации холерного вибриона. С учетом полученных результатов и имеющихся паспортных данных осуществлена комплексная оценка патогенных, фено- и генотипических особенностей штаммов. Согласно полученным данным, был сформирован набор из 15 штаммов бактерий, при использовании которого слушатели курсов могут освоить весь спектр регламентированных методов индикации, идентификации возбудителя холеры и дифференциации его от других представителей рода *Vibrio* и других родов, способных вызывать заболевания у человека с явлениями гастроэнтерита.

Сформирован учебный набор штаммов бактерий для изучения микробиологии и лабораторной диагностики холеры, включающий:

- холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп: *Vibrio cholerae* 569B серогруппа O1 биовар классический серовар Инаба, *Vibrio cholerae* KM26 серогруппа O1 биовар *El Tor* серовар Огава, *Vibrio cholerae* M-375 (170) серогруппа O139 (II группа патогенности);
- возбудители гастроэнтеритов и системных инфекций – *Vibrio cholerae* non O1/O139 M-266 (III группа патогенности);
- представители рода *Vibrio*: *Vibrio albensis* 220, *Vibrio alginolyticus* 143, *Vibrio parahaemolyticus* 616 (IV группа патогенности);
- возбудители острых кишечных инфекций у человека: *Shigella sonnei* 714; *Salmonella paratyphi* «B» M-53 (625) (III группа патогенности); *Aeromonas hydrophila* P-4499; *Plesiomonas shigelloides* 101; *Escherichia coli* O 151 1027 (IV группа патогенности);
- штаммы микроорганизмов, необходимые для дифференциальной диагностики возбудителя холеры: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* BKMB-1300, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 (IV группа патогенности);
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) (IV группа патогенности).

Далее был определен алгоритм использования каждого штамма с учетом его биологических свойств и вирулентности для изучения микробиологии холерного вибриона и регламентированных методов индикации и идентификации возбудителя холеры в полном объеме.

Штамм *Vibrio cholerae* 569B серогруппа O1 биовар классический серовар Инаба предлагается для изучения типичных видовых свойств *V. cholerae*: морфологических, культуральных, биохимических, антигенных; для демонстрации тестов, дифференцирующих биовары классический и Эль Тор возбудителя холеры: отсутствие гемолитической активности в посевах на агаре Хоттингера pH 7,6 с добавлением 5% дефибринированной крови барана, в пробе Грейга со взвесью 1% бараньих эритроцитов в физиологическом растворе; наличие чувствительности к полимиксину В (50 ед./мл); чувствительности к холерному диагностическому бактериофагу С. Поскольку штамм продуцирует холерный токсин *in vitro* (генетические характеристики: *ctxA*⁺ *tcpA*⁺), его использование ограничивается демонстрацией изложенных признаков.

Штамм *Vibrio cholerae* KM26 серогруппа O1 биовар *El Tor* серовар Огава обладает типичными для *V. cholerae* морфо-

логическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами. Генетические характеристики: *ctxA⁻ zot tcpA⁻ toxR⁻*. Штамм используется для изучения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств возбудителя холеры; для освоения алгоритма лабораторной диагностики холеры, МФА, идентификации.

Штамм *Vibrio cholerae* M-375 (170) серогруппа O139 обладает типичными для микроорганизмов данной серогруппы морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами. Генетические характеристики: *ctxA⁻*. Авирулентный для кроликов-сосунков. Штамм рекомендовано использовать для изучения свойств *Vibrio cholerae* O139 серогруппы; для освоения алгоритма лабораторной диагностики холеры, МФА, идентификации.

Штамм *Vibrio cholerae* non O1/O139 M-266 (4656) целесообразно использовать на практических занятиях слушателями курсов для изучения морфологических, культуральных, биохимических свойств *Vibrio cholerae*, поскольку обладает типичными видовыми свойствами; для изучения дифференциальных биохимических тестов представителей рода *Vibrio*, для дифференциации *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп от *Vibrio cholerae* non O1/O139, а также для дифференциации *Vibrio cholerae* с микроорганизмами, сходными по морфологическим свойствам и выделяемыми из клинического материала от больных с явлениями гастроэнтерита и из внешней среды.

В состав набора включены следующие штаммы представителей рода *Vibrio*, используемые для освоения принципов и методов дифференциальной диагностики с *Vibrio cholerae*: штамм *Vibrio albensis* 220 (261–320) – для изучения способности микроорганизмов к флюоресценции в темноте, используется при изучении внутривидовых дифференциальных признаков рода *Vibrio*. Штамм *Vibrio alginolyticus* 143 представлен для изучения дифференциальных тестов представителей рода *Vibrio*, в частности, признака галофильности данной культуры – способности к росту в 1% пептонной воде с высокими концентрациями хлорида натрия (7–10%) и «феномена роения». Штамм *Vibrio parahaemolyticus* 616 – для изучения дифференциальных биохимических тестов представителей *Vibrio*; признаков дифференциации возбудителя холеры от других вибрионов, вызывающих у людей пищевые токсикоинфекции и острые кишечные инфекции при употреблении в пищу морепродуктов, подвергнутых недостаточной кулинарной обработке, и свойства галофильности.

Для изучения алгоритма дифференциации возбудителя холеры от микроорганизмов, сходных по морфологическим, культуральным и некоторым биохимическим свойствам с *Vibrio cholerae* (продуцируют индофенолоксидазу), в наборе имеются штаммы микроорганизмов, выделяемые из клинического материала от больных с острыми кишечными инфекциями и из объектов внешней среды: *Aeromonas hydrophila* P-4499, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ВКМВ-1300, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853.

Для овладения принципами и методами дифференциальной диагностики возбудителя холеры набор содержит штаммы возбудителей токсикоинфекций и острых кишечных инфекций семейства *Enterobacteriaceae*: *Shigella sonnei*

M-88 (714), *Salmonella enterica* spp. *enterica* ser. *paratyphi* «B» M-53 (625), *Escherichia coli* 1027 O 151.

Штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) включен в состав набора для изучения принципов дифференциальной диагностики возбудителя холеры с возбудителями токсикоинфекций.

Все вышеперечисленные штаммы бактерий обладают стабильными типичными морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами, хорошо сохраняются на искусственных питательных средах.

При составлении набора штаммов для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики холеры одними из основных задач явились минимизация риска инфицирования возбудителем холеры слушателей курсов на практических занятиях и одновременное предоставление возможности изучения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств возбудителя холеры, освоения регламентированных методов специфической индикации и идентификации в полном объеме. Для поэтапной замены вирулентных штаммов возбудителя холеры на менее вирулентные и авирулентные были подобраны штаммы холерного вибриона, представителей рода *Vibrio* и микроорганизмов, применяемых для дифференциальной диагностики возбудителя холеры, использование которых позволяет решить поставленные задачи, а также в процессе обучения приобрести навыки работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с ПБА.

С учетом установленных биологических свойств и вирулентности микроорганизмов, включенных в набор штаммов, разработан алгоритм использования каждого штамма для изучения микробиологии холерного вибриона и регламентированных методов его индикации и идентификации, который позволяет обеспечить в полном объеме реализацию планов практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика холеры» (табл. 1).

На следующем этапе были разработаны стандартные учебные образцы, моделирующие пробы биологического материала и объектов окружающей среды, содержащие штаммы холерных вибрионов и других бактерий, включенных в набор. Пробы представляют собой образцы, с достаточной точностью имитирующие реальный биотический или абиотический объект в целях освоения методов специфической индикации и идентификации возбудителя холеры. Проба состоит из основы (биологические жидкости человека или их имитаторы, объекты окружающей среды или их имитаторы) и микроорганизмов, введенных в основу. Нами разработаны составы основ, не влияющие на качество и сроки получения результатов индикации и идентификации возбудителя холеры регламентированными методами, а также концентрации и соотношения микроорганизмов II–IV групп патогенности, входящих в состав учебных образцов.

В качестве основы при приготовлении проб были использованы:

- биологические выделения человека (испражнения);
- объекты окружающей среды (вода, смывы с объектов и другие);
- пищевые продукты плотные и жидкие (рыба и морепродукты, листья салата, молоко, напитки);

Таблица 1. Применение набора учебных штаммов на практических занятиях по микробиологии и лабораторной диагностике холеры

Тема	Штамм
Изучение морфологических, культуральных, биологических, биохимических свойств <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266
Освоение определения подвижности холерного вибриона методами «висячей» и «раздавленной» капли	<i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266
Изучение морфологических и культуральных свойств <i>Vibrio cholerae</i> различных серогрупп и биоваров (демонстрация мазков с окраской по Граму и холерными флюоресцирующими иммуноглобулинами O1 и O139, посевов на плотные и жидкие питательные среды)	<i>Vibrio cholerae cholerae</i> 569B <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Escherichia coli communis</i>
Изучение агглютинабельности культур <i>Vibrio cholerae</i> холерными диагностическими сыворотками O1 и O139 в слайд-агглютинации и объемным методом	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139
Освоение лабораторной диагностики холеры бактериологическим методом	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Escherichia coli communis</i>
Освоение методов специфической индикации возбудителя холеры (МФА, РИВ)	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139
Освоение тестов дифференциальной диагностики <i>Vibrio cholerae</i> с другими представителями рода <i>Vibrio</i> , вызывающими у человека пищевые токсикоинфекции и острые кишечные инфекции и выделяемыми из воды открытых водоемов	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 616 <i>Vibrio alginolyticus</i> 143 <i>Vibrio albensis</i> 220
Освоение алгоритмов дифференциальной диагностики <i>Vibrio cholerae</i> с микроорганизмами, сходными по морфологическим, культуральным и некоторым биохимическим свойствам (оксидазоположительными) и выделяемыми из клинического материала от больных с острыми кишечными инфекциями и из объектов внешней среды	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Aeromonas hydrophila</i> P-4499 <i>Plesiomonas shigelloides</i> 101 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> BKMB-1300 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 27853
Освоение принципов дифференциальной диагностики <i>Vibrio cholerae</i> с возбудителями токсикоинфекций и острых кишечных инфекций семейства <i>Enterobacteriaceae</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> у человека	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Shigella sonnei</i> 714 <i>Salmonella paratyphi</i> «B» M-53B (625) <i>Escherichia coli</i> 1027 O 151 <i>Escherichia coli communis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (209-P)
Приготовление проб для занятий по теме «Комплексное исследование материала, подозрительного на наличие возбудителя холеры. Контрольная бактериологическая задача»	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Aeromonas hydrophila</i> P-4499 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> BKMB-1300 <i>Shigella sonnei</i> 714 <i>Salmonella paratyphi</i> «B» M-53 (625) <i>Escherichia coli</i> 1027 O 151 <i>Escherichia coli communis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (209-P)

• имитаторы биологических жидкостей человека и объектов окружающей среды (питательный бульон pH 7,6, физиологический раствор, коллоидный раствор крахмала и другие).

При подготовке проб, содержащих холерный вибрион, для обучения его индикации МФА, реакции непрямо́й гемагглютинации (РНГА), а также выделения и идентификации *V. cholerae* ускоренным и классическим бактериологическими методами использовали авирулентные штаммы *V. cholerae* El Tor KM 26, *V. cholerae* M-375 (170) серогруппы O139, а также *V. cholerae* non O1/O139 M-266 в концентрации, достаточной для индикации методами лабораторной диагностики, регламентированными в действующих нормативно-методических документах.

При моделировании пробы из объектов окружающей среды (воды из поверхностных водоемов, сточных вод, смывов с поверхностей), проб пищевых продуктов и части проб биологического материала («испражнения больного»), которые в реальных условиях содержат смесь микроорганизмов, помимо возбудителя холеры, добавляют «фоновые» микроорганизмы. В качестве «фона» используют микроорганизмы III–IV групп патогенности, например: *Escherichia coli commu-*

nis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и другие. Не рекомендуется использовать в качестве фоновых культур микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Aeromonas* в связи с необходимостью дифференциации с *V. cholerae* (табл. 2).

Разработаны 11 проб-имитаторов для проведения практических занятий учебного модуля по следующим темам:

- «Исследование клинического материала с подозрением на холеру» (испражнений, рвотных масс, желчи больного с подозрением на холеру);
- «Исследование объектов окружающей среды на холеру» (смыва, проб воды из поверхностного водоема, сточных вод);
- «Исследование пищевых продуктов на холеру» (пробы рыбы, молока, салата);
- «Иммунологические методы в схеме лабораторной диагностики холеры»;
- «Комплексное исследование материала, подозрительного на содержание возбудителя холеры. Контрольная бактериологическая задача».

Таким образом, на основании проведенных исследований и многолетнего опыта работы сформирован набор учебных

Таблица 2. Перечень микроорганизмов, рекомендуемых для использования при подготовке проб-имитаторов

Объекты исследования	Наименование микроорганизмов	
	основные	фоновые
Испражнения	<i>V. cholerae</i>	<i>E. coli communis</i> <i>S. epidermidis</i>
Рвотные массы	<i>V. cholerae</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>E. coli communis</i>
Смыв с поверхности	<i>V. cholerae</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli communis</i> <i>Bac. cereus</i>
Проба воды из поверхностного водоема	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 266-M	–
Проба сточных вод	<i>V. cholerae</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>E. coli communis</i> <i>Bac. cereus</i>

штаммов, который позволяет решить поставленные задачи: 1) освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики холеры; 2) снизить вероятность лабораторного инфицирования возбудителем холеры обучающихся на практических занятиях; 3) приобрести навыки работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с ПБА.

Возможность реализации разнообразных образовательных программ на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора позволяет следовать принципу преемственности обучения специалистов методам лабораторной диагностики холеры, начиная с курсов профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям, в дальнейшем приобретая новые теоретические знания и умения на различных курсах повышения квалификации. Это необходимо для подготовки кадров, призванных обеспечивать комплекс мероприятий по эпиднадзору за холерой на территории РФ.

Литература

1. Москвитина ЭА, Тюленева ЕГ, Кругликов ВД, Титова СВ, Водопьянов АС, Куриленко МЛ, и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2018;1:36-43. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-36-43
2. Еровиченков АА, Зверева НН, Сайфуллин МА, Околот НВ. Профилактика заводных инфекционных заболеваний у путешественников. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018;17(5):89-94. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-89-95
3. Чемисова ОС, Сагакянц ММ, Голенищева ЕН, Санамянц ЕМ. Оценка бактерицидной активности дезинфекционных средств в отношении возбудителя холеры для деконтаминации судовых балластных вод. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018;7(3):15-9. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13002
4. Смирнова НИ, Агафонова ЕЮ, Шелканова ЕЮ, Агафонов ДА, Краснов ЯМ, Ливанова ЛФ, Кутырев ВВ. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018;36(2):76-84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84
5. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации». СП 3.1.1.2521-09
6. Методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». МУК 4.2.2870-11
7. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13

8. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08
9. Методические указания «Лабораторная диагностика холеры». МУК 4.2.2218-07

References

1. Moskvitina EA, Tyuleneva EG, Kruglikov VD, Titova SV, Vodop'yanov AS, Kurilenko ML, et al. Cholera: Assessment of Epidemiological Situation on Cholera around the World and in Russia in 2008–2017. Forecast for 2018. Problems of Particularly Dangerous Infection. 2018;1:36-43. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-36-43 (In Russian).
2. Erovichenkov AA, Zvereva NN, Sayfullin MA, Okolot NV. Prevention of Imported Infectious Diseases in Travelers. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018;17(5):89-94. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-89-95 (In Russian).
3. Chemisova OS, Sagakyants MM, Golenishcheva EN, Sanamyants EM. Evaluation of the disinfectants bactericidal activity against the causative agent of cholera for the decontamination of ship's ballast water. Infectious diseases: News, Opinions, Training. 2018;7(3):15-9. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13002 (In Russian).
4. Smirnova NI, Agafonova EYu, Shchelkanova EYu, Agafonov DA, Krasnov YaM, Livanova LF, Kutyrev VV. Genomic diversity of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strains, isolated in the territory of Russia and neighboring states. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2018;36(2):76-84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84 (In Russian).
5. Sanitary and Epidemiological Rules "Prevention of cholera. General requirements for epidemiological surveillance of cholera in the territory of the Russian Federation". SP 3.1.1.2521-09 (In Russian).
6. Methodical Instructions "Order of the organization and carrying out laboratory diagnostics of cholera for laboratories of territorial, regional and federal levels". MUK 4.2.2870-11 (In Russian).
7. Sanitary and Epidemiological Rules "Safety of work with microorganisms of I-II groups of pathogenicity (danger)". SP 1.3.3118-13 (In Russian).
8. Sanitary and Epidemiological Rules "Safety of work with microorganisms of III-IV groups of pathogenicity (danger) and causative agents of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08 (In Russian).
9. Methodical Instructions "Laboratory diagnostics of cholera". MUK 4.2.2218-07 (In Russian).

Информация об авторах:

Тихомирова Людмила Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Information about cauthors:

Ljudmila A. Tikhomirova, PhD (Biology), senior researcher of the department of educational programs and training of specialists, RusRAPI "Microbe" of the Rospotrebnadzor
Address: 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-52-30
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Yuri A. Popov, PhD, DSc (Biology), professor, chief researcher, acting head of the department of educational programs and training of specialists, RusRAPI "Microbe" of the Rospotrebnadzor
Address: 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей

А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, В.П.Мякина,
В.М.Красильникова, В.В.Верёвкин, Н.В.Воложанцев

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

Распространение бактерий с множественной лекарственной устойчивостью является серьезной проблемой практического здравоохранения. Эра эффективного использования классических антибиотиков в борьбе с бактериальными инфекциями уходит в прошлое. В настоящее время ведутся интенсивные поиски комбинированной антибиотикотерапии и новых антибактериальных препаратов, альтернативных антибиотикам. Заслуженный интерес у исследователей вызывают бактериофаги – вирусы бактерий, способные лизировать как антибиотикочувствительные, так и антибиотикорезистентные штаммы бактерий. В нашей работе мы исследовали лечебно-профилактическую эффективность литического бактериофага PA5 на двух моделях летальной синегнойной инфекции у мышей линии BALB/c – первичного сепсиса и инфекции мягких тканей бедра. Полученные результаты показали, что при внутривенном введении фага в дозе 10^8 БОЕ в режиме профилактики выживаемость мышей с первичным синегнойным сепсисом достигает 100%. При фаготерапии через 1,5 ч после инфицирования и далее в течение 5 дней лечебный эффект достигался в 70–80% случаев. Использование фага PA5 для профилактики и лечения синегнойной инфекции бедра не дало положительного терапевтического эффекта: все животные, зараженные внутримышечно культурой *P. aeruginosa* PAO1 или *P. aeruginosa* B1304, умирали на 1–6-е сутки. В то же время полимиксин В (10 мг/кг, 2 р/сут, 5 дней) защищал от гибели 100% мышей с первичным сепсисом и инфекцией мягких тканей бедра. Таким образом, по антибактериальной активности *in vivo* бактериофаг PA5 близок к антибиотику полимиксину, но только при профилактике и лечении синегнойного сепсиса у мышей. Фаг PA5 неэффективен при терапии летальной синегнойной инфекции бедра, тогда как антибиотик излечивает 100% мышей, инфицированных культурами штаммов *P. aeruginosa* PAO1 или *P. aeruginosa* B1304.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, синегнойная инфекция, мыши, бактериофаги, фаготерапия, полимиксин В

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Мякина В.П., Красильникова В.М., Верёвкин В.В., Воложанцев Н.В. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019; 4(1): 34–43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43

Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice

A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, V.P.Myakinina,
V.M.Krasilnikova, V.V.Verevkin, N.V.Volozhantsev

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

The spread of multiple drug resistant bacteria is a serious problem in practical healthcare. The era of effective use of classical antibiotics to combat bacterial infections is a thing of the past. Currently, intensive search for combined antibiotic therapy as well as novel alternative antimicrobials is underway. Of particular scientific interest are bacteriophages, bacterial viruses, capable of lysing both antibiotic-susceptible and -resistant bacterial strains. We studied a therapeutic – and prophylactic effect of the lytic phage PA5 using two models of *Pseudomonas aeruginosa* lethal infection, primary sepsis and femoral soft tissue infection, in BALB/c mice. The preventive *i/p* injection of the phage at 10^8 PFU to mice with *P. aeruginosa* sepsis resulted in the 100% survival of the mice. The 5-day therapeutic injection of the phage provided a therapeutic effect 1.5h after infection in 70–80% of cases. The phage PA5 used for preventing or treating *Pseudomonas aeruginosa* femoral soft tissue infection did

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область,
ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0147

E-mail: borzilov@obolensk.org

Статья поступила 27.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Alexander I. Borzilov, MD, PhD, leading researcher
of the biological testing laboratory, State Research Center
of Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation

Phone: (4967) 36-0147

E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 27.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

not produce a positive therapeutic effect, leading to death of all animals i/m infected with *P. aeruginosa* PAO1 or *P. aeruginosa* B1304 culture at day 1 or 6. Meantime polymyxin B (10 mg/kg, twice a day for 5 days) saved mice with sepsis or femoral soft tissue infection in 100% of cases.

Results conclude that the phage PA5 antibacterial activity *in vivo* is similar to that of polymyxin, but just in preventing and treating *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. The phage is ineffective in treating *Pseudomonas aeruginosa* lethal femoral infection, while the antibiotic cures mice infected with *P. aeruginosa* PAO1 or *P. aeruginosa* B1304 cultures in 100% of cases.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* infection, mice, bacteriophages, phage therapy, polymyxin B

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Myakinina V.P., Krasilnikova V.M., Verevkin V.V., Volozhantsev N.V. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. *Bacteriology*. 2019; 4(1): 34–43. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43

Грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* являются одной из основных причин внутрибольничных инфекций [1]. Они способны вызывать как локализованные, так и системные инфекции, включая гнойные воспаления ожоговых ран, пневмонию, абдоминальные инфекции, хронические язвы и сепсис [2–5]. Наибольшему риску синегнойной инфекции подвержены люди с иммунодефицитом [1]. Наиболее часто синегнойная инфекция встречается в отделениях интенсивной терапии, где ее доля среди бактериальных инфекций составляет от 8 до 20% [2–4]. По некоторым данным, *P. aeruginosa* является причиной 16% нозокомиальных пневмоний, 10% инфекций мочевыводящих путей, 10% послеоперационных инфекций и 4% бактериемий [5]. Этиотропная терапия инфекций, вызываемых синегнойной палочкой, включает, как правило, использование β-лактамов, макролидов и колистина [6–9]. Широкое использование различных антибактериальных препаратов нередко приводит к появлению штаммов *P. aeruginosa*, устойчивых к лекарственным средствам [10–14], что затрудняет лечение синегнойной инфекции и ухудшает ее прогноз. Способность бактерий *P. aeruginosa* формировать биопленки также снижает эффективность антибиотикотерапии [15, 16].

В связи с этим в настоящее время ведутся поиск эффективных схем комбинированного применения антибиотиков и разработка новых антипсевдомонадных препаратов, альтернативных антибиотикам [12, 17–19]. Одной из перспективных альтернатив антибиотикам являются вирусы бактерий (бактериофаги). В научных источниках встречается много сообщений о положительных результатах применения литических бактериофагов для профилактики и лечения различных инфекций у лабораторных животных [20–24], в том числе вызываемых синегнойной палочкой [25–27].

Для оценки лечебной эффективности антибактериальных средств, направленных против *P. aeruginosa*, используют различные животные модели синегнойной инфекции. Одной из наиболее популярных является модель экспериментальной легочной инфекции мышей [17, 28–30]. В качестве экспериментальных животных используют инбредных и аутбредных иммунокомпетентных или иммунодепрессивных мышей. В качестве возбудителя экспериментальной синегнойной легочной инфекции часто выбирают общеизвестный штамм *P. aeruginosa* PAO1 или какой-либо клинический штамм. Заражающая доза патогена варьирует от 5×10^6 до 5×10^8 КОЕ.

Некоторые авторы описывают и успешно применяют на практике модели раневой синегнойной инфекции [31] и синегнойной инфекции мягких тканей бедра [30, 32–34]. Для моделирования термической раны кожных покровов используют иммунокомпетентных животных, для воспроизведения инфекции бедра – мышей с индуцированной лейкопенией. Инфицированную рану кожных покровов получают путем аппликации культуры патогена на ожоговую поверхность. Инфекцию бедра воспроизводят путем введения культуры синегнойной палочки в бедренную мышцу мышей в дозе 5×10^5 – 5×10^6 КОЕ.

Эффективность противопсевдомонадных препаратов тестируют и на модели летального сепсиса у мышей [35]. Для подавления иммунитета мышам вместе с культурой патогена внутрибрюшинно вводят 5% муцин. В этом случае клетки *P. aeruginosa* быстро диссеминируют в организме подопытных животных, колонизируя паренхиматозные органы и вызывая бактериемию. Животные погибают в течение трех суток после заражения. Сепсис моделируют и на иммунокомпетентных мышах, однако в этом случае используют более вирулентные клинические штаммы, а заражающую дозу *P. aeruginosa* увеличивают до 10^7 КОЕ [36].

Цель работы – изучить антибактериальную активность *in vivo* бактериофага PA5 в экспериментах по лечению острого синегнойного сепсиса и синегнойной инфекции бедра у мышей, вызываемых культурами штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Для моделирования экспериментальной синегнойной инфекции использовали культуры штаммов *P. aeruginosa* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» – PAO1 (кат. № В-168) и B1304 (кат. № В-7708). Оба штамма чувствительны *in vitro* к цефтазидиму, цефепиму, имипенему, гентамицину, ципрофлоксацину и полимиксину В. *P. aeruginosa* B1304 устойчив к цефотаксиму и доксициклину. Штамм *P. aeruginosa* PAO1 обладал промежуточной устойчивостью к цефотаксиму, амикацину и был нечувствителен к доксициклину.

Питательные среды, антибиотики

Для культивирования штаммов синегнойной палочки использовали плотную питательную среду №1 ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

LB-бульон (Hi-Media, Индия) использовали для наработки бактериофага PA5.

Веллобактин-В/Полимиксин-В («Бхарат Сирамс энд Ваксинс Лимитед», Индия) использовали в качестве эффективного антибиотика в экспериментах по лечению экспериментальной синегнойной инфекции.

Выделение бактериофага PA5

Препарат бактериофага PA5 готовили из лизата бульонной культуры штамма *P. aeruginosa* 1304. Культуру синегнойных бактерий выращивали в LB-бульоне при температуре 37°C до логарифмической фазы роста. Затем добавляли бактериофаг в соотношении 1:10 по объему и продолжали инкубировать до полного просветления культуры. В фаголизат вносили хлористый натрий до концентрации 1 М, инкубировали 2 ч в водяной бане при температуре 0°C и центрифугировали (15 000 xg, 10 мин при температуре 4°C). В супернатант добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) 8000 до концентрации 10% и инкубировали 2 ч в водяной бане при температуре 0°C. Бактериофаги осаждали центрифугированием при 39 000 xg в течение 10 мин при температуре 4°C. Осадок тщательно высушивали при комнатной температуре и суспендировали в физиологическом растворе. Титр фаговых частиц в препарате определяли методом Грациа [37].

Лабораторные животные

В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали белых мышей линии BALB/c (самцы/самки, 18–22 г), выращенных в питомнике ФБУН ГНЦ ПМБ. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва).

Животных размещали в поликарбонатных клетках Lab Products Inc. (США) группами не более шести особей в каждой и проводили ежедневное ветеринарное наблюдение за ними.

Моделирование синегнойного сепсиса у мышей

Бактериальные культуры готовили на физиологическом растворе, содержащем 2,5% муцин. Заражающие дозы штаммов PAO1 и B1304 составляли 10 ЛД₅₀, что соответствовало ~8 × 10⁴ КОЕ и ~6 × 10⁵ КОЕ. Взвеси штаммов *P. aeruginosa* вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

Моделирование синегнойной инфекции мягких тканей бедра у мышей

Бедренную синегнойную инфекцию воспроизводили на мышцах линии BALB/c с индуцированным иммунодефицитом. Для этого животным дважды вводили циклофосфамид (100 мг/кг, внутрибрюшинно) за 4 и 1 сут до заражения. Инокуляты культур синегнойной палочки вводили внутримышечно (в левое бедро) в дозе 30 ЛД₅₀: 3,3 × 10⁵ КОЕ штамма *P. aeruginosa* PAO1 и 1,9 × 10⁵ КОЕ штамма *P. aeruginosa* B1304. Вводимый объем инокулята – 50 мкл.

Бактериологический анализ биологических образцов

Обсемененность органов и тканей мышей бактериями *P. aeruginosa* определяли количественным методом с подсчетом числа клеток патогена в 1 г/мл образца. Для этого животных эвтаназируют углекислым газом, затем вскрывали в асептических условиях и отбирали печень и селезенку целиком. Паренхиматозные органы взвешивали, а затем

перетирали пестиком в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенизаты добавляли стерильный физиологический раствор (1–3 мл) и перемешивали до получения однородной суспензии. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения) высеивали на поверхность плотной питательной среды. Образцы крови получали пункцией сердца эвтаназированных животных и смешивали с 3,7% цитратом натрия в соотношении 3:1. Кровь высеивали на питательный агар *ex tempore*. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

Лечение экспериментального синегнойного сепсиса

Мышей линии BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурами штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304, рандомизировали на равные экспериментальные и контрольные группы по 10 животных в каждой. Мышам из первой экспериментальной группы вводили бактериофаг PA5 внутрибрюшинно однократно в количестве 5 × 10⁸ БОЕ за 1 ч до заражения (группа профилактики). Вторая группа животных получала препарат фага в той же дозе дважды в день на протяжении 5 сут. Лечение начинали через 1,5 ч после заражения синегнойной инфекцией. Третьей группе животных назначали подкожные инъекции полимиксина в дозе 10 мг/кг дважды в сутки. Лечение начинали через 1,5 ч после инфицирования и продолжали в течение 5 дней. Контрольная группа животных никаких антибактериальных препаратов не получала.

Наблюдение за животными вели в течение 14 дней с момента заражения, отмечая случаи гибели животных. В конце указанного срока выживших мышей исследовали на носительство бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304.

Лечение экспериментальной синегнойной инфекции бедра

Мышей линии BALB/c с индуцированным иммунодефицитом и инфицированных в левое бедро культурами *P. aeruginosa* PAO1 или *P. aeruginosa* B1304 делили на 4–5 экспериментальных групп случайным образом. Животные из 1-й группы за 1 ч до инфицирования однократно внутрибрюшинно получали фаг PA5 в дозе 1 × 10⁸ БОЕ (группа профилактики). Животных из 2-й группы начинали лечить бактериофагом PA5 через 1,5 ч после заражения дважды в день в течение 5 сут. Разовая доза фага составляла 1 × 10⁸ БОЕ внутрибрюшинно. Мышам из 3-й группы давали фаг PA5 по той же схеме, но препарат вводили подкожно (только в случае штамма *P. aeruginosa* B1304). Бактериофаг вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, а подкожно – 0,2 мл. Животным из 4-й группы в течение 5 дней после заражения назначали полимиксин В (10 мг/кг) дважды в сутки подкожно в объеме 0,2 мл. Контрольная группа мышей не получала антибактериальных препаратов. В течение 2 нед после заражения контролировали гибель животных в группах. В конце эксперимента оценивали обсемененность паренхиматозных органов выживших животных бактериями *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов (вычисление средних арифметических значений и стандартного отклонения) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.

Результаты и обсуждение

Характеристика бактериофага PA5

Бактериофаг PA5 выделен из сточных вод (г. Серпухов, Московская обл.) и депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (кат. № Ph-88).

На газоне индикаторных штаммов *P. aeruginosa* фаг образует прозрачные негативные колонии диаметром 1–2 мм. Фаголизат, полученный при размножении бактериофага PA5 на клетках штамма *P. aeruginosa* B1304, устойчив к хлороформу и чувствителен к нагреванию (при температуре 55°C фаговые частицы инактивируются в течение 15 мин). Фаг хорошо сохраняется в лиофильно высушенном состоянии при температуре 4–8°C. Титр бактериофага PA5 при размножении на жидких и плотных питательных средах составляет около 10^{10} бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл фаголизата. Бактериофаг PA5 обладает достаточно широким спектром активности: лизирует около 30% клинических штаммов *P. aeruginosa* ($N = 46$), выделенных в различных стационарах лечебных учреждений (Серпухов, Челябинск, Вологда, Москва).

Определена полная нуклеотидная последовательность генома бактериофага PA5 (GenBank: KY000082). Геном представлен линейной двунитевой ДНК размером 66 182 пары оснований (содержание G/C-пар – 55,5%), включает 101 открытую рамку считывания (ORF), кодирующую 24% белков с предсказанными функциями (структурные белки капсида и хвостового аппарата, ферменты метаболизма ДНК, компоненты системы упаковки ДНК в капсид и лизиса бактериальной клетки) и 76% гипотетических пептидов с неустановленными функциями. В геноме фага не выявлены гены резистентности к антибиотикам и какие-либо известные детерминанты вирулентности бактериальных патогенов. На основании данных секвенирования ДНК и сравнительного геномного анализа бактериофаг PA5 отнесен к вирусам семейства *Myoviridae*, группе неклассифицированных фагов рода *Pbunavirus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1913570>).

Развитие летального синегнойного сепсиса у мышей

Результаты изучения динамики развития сепсиса в организме мышей линии BALB/c показали, что уже через 1,5 ч наблюдается интенсивная диссеминация патогена. Концентрация клеток *P. aeruginosa* PAO1 в селезенке, печени и легких составляла в среднем $6,3 \times 10^3$, $6,8 \times 10^3$ и 3×10^3 КОЕ/г соответственно (рис. 1А). В последующие 12 ч уровень обсемененности этих органов бактериями *P. aeruginosa* возрастал на три порядка и достигал значений $6,8 \times 10^6$, $5,1 \times 10^6$ и $2,7 \times 10^6$ КОЕ/г. Бактериемия у инфицированных животных также быстро прогрессировала. Через 1,5 ч после заражения количество клеток синегнойной палочки в 1 мл крови в среднем равнялось 122 КОЕ/мл, а через 12 ч – $1,7 \times 10^5$ КОЕ/мл.

Введение мышам культуры штамма *P. aeruginosa* B1304 также приводило к быстрой диссеминации клеток патогена в организме животных. Через 1,5 ч после инфицирования уровень содержания синегнойной палочки в селезенке, печени и легких составлял $1,8 \times 10^4$, $2,8 \times 10^4$ и $9,2 \times 10^3$ КОЕ/г соответственно (рис. 1Б). По истечении 12 ч экспериментальной инфекции концентрация клеток патогена в этих органах увеличивалась до $1,7 \times 10^7$, $1,3 \times 10^7$ и $1,2 \times 10^7$ КОЕ/г соответственно. Септицемия у инфицированных мышей быстро прогрессировала в период с 1,5 до 12 ч после заражения, возрастая с $1,2 \times 10^3$ до $1,1 \times 10^6$ КОЕ/мл. Все мыши, инфицированные культурой *P. aeruginosa* B1304, погибали в течение суток на фоне выраженного синегнойного сепсиса, что подтверждалось результатами бактериологического исследования.

Эффективность лечения летального синегнойного сепсиса у мышей

Результаты экспериментов по профилактике и лечению летального синегнойного сепсиса у мышей линии BALB/c, обусловленного внутрибрюшинным заражением культурами штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304 в дозе 10 ЛД₅₀, показали высокую специфическую активность бактериофага PA5. При однократном введении фага мышам за час до инфицирования (профилактика) все животные оставались живыми на протяжении всего срока наблюде-

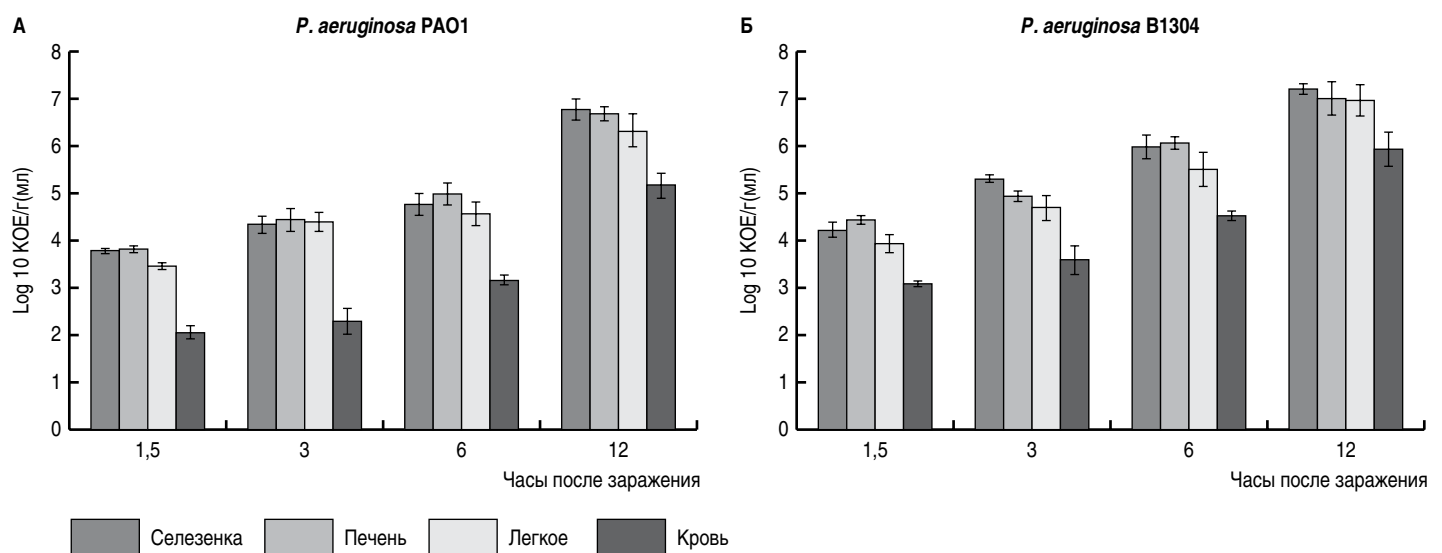


Рис. 1. Динамика колонизации клетками *P. aeruginosa* организма мышей после внутрибрюшинного введения в дозе 10 ЛД₅₀.

ния (рис. 2). В то же время 100% мышей из контрольных групп умирали в течение суток. Все выжившие животные не были носителями бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304. Количественный бактериологический анализ печени, селезенки, легких и крови мышей дал отрицательный результат.

Применение фага PA5 в режиме лечения (начало фаготерапии через 1,5 ч после заражения) оказывало меньший эффект. Фаг защищал от гибели 80% мышей, инфицированных штаммом PAO1, и 70% мышей, зараженных штаммом B1304. Животные погибали в период со вторых по седьмые сутки. В органах погибших мышей была выявлена культура возбудителя синегнойной инфекции. В этих же органах был обнаружен в большом количестве фаг PA5.

В результате лечения бактериофагом PA5 у 4 из 8 выживших мышей была выявлена культура *P. aeruginosa* PAO1 в селезенке и печени. Концентрация клеток патогена в этих органах варьировала от $1,5 \times 10^3$ до $8,1 \times 10^5$ КОЕ/г (таблица). Культура, выделенная из органов мышей, была устойчива к литическому действию бактериофага PA5.

Несмотря на то что фаг PA5 в режиме лечения защищал от гибели только 70% мышей, зараженных штаммом *P. aeruginosa* B1304, он более эффективно санировал организм животных. Все выжившие мыши были свободны от возбудителя экспериментальной инфекции.

Пятидневный курс антибиотикотерапии летального синегнойного сепсиса полимиксином дал абсолютный лечебный результат. Все мыши к концу срока наблюдения были живы и не являлись носителями *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304.

Развитие летальной синегнойной инфекции бедра у мышей

Исследование динамики развития данной инфекции на примере штамма *P. aeruginosa* B1304 показало, что распространение клеток патогена в организме мышей начинается через некоторое время после внутримышечного заражения (рис. 3). Бактериологический анализ органов и тканей мышей, проведенный через 1,5 ч после инфицирования, показал наличие патогена только в месте введения. Концентрация клеток *P. aeruginosa* B1304 в месте инъекции в это время составляла 2×10^5 КОЕ/г.

В течение первых 3 ч после заражения инфекция в основном локализовалась в мышечной ткани левого бедра, а затем происходило размножение синегнойной палочки в очаге воспаления, и через 36 ч ее количество в левом бедре достигало в среднем $1,4 \times 10^9$ КОЕ/г.

В селезенке единичные клетки *P. aeruginosa* B1304 были выявлены через 3 ч после инфицирования у 40% мышей, а через 5 ч уже у 100% мышей селезенка была обсеменена возбудителем (от $6,0 \times 10^2$ до $1,4 \times 10^3$ КОЕ/г). Через 1,5 сут

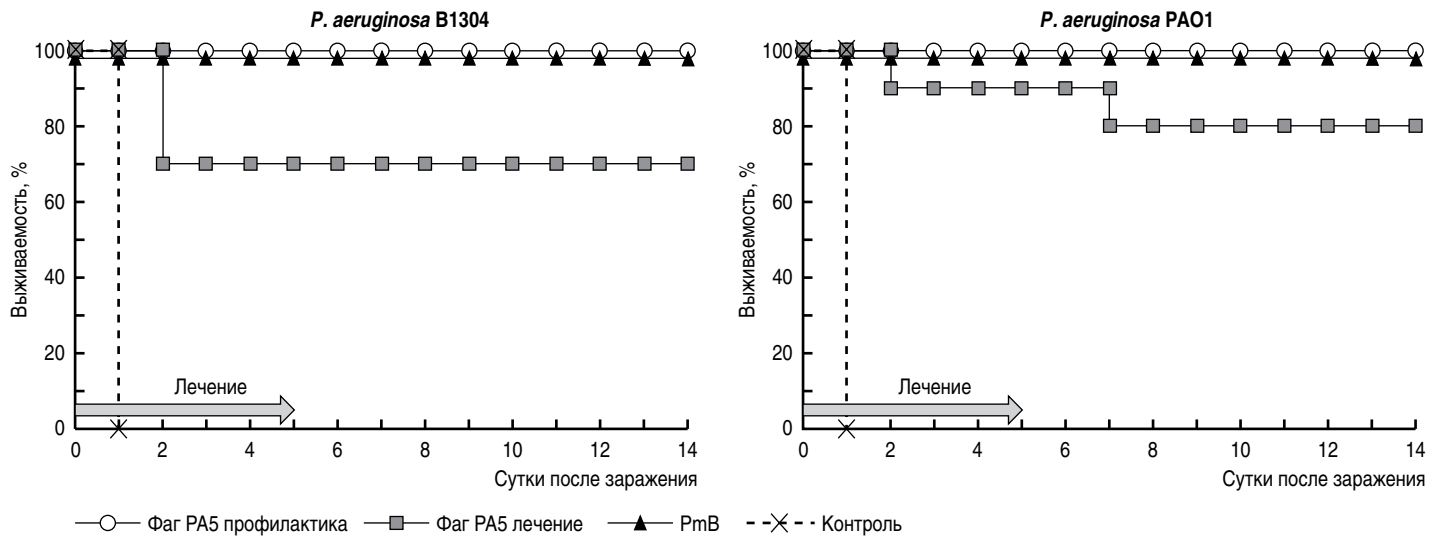


Рис. 2. Эффективность бактериофага PA5 и полимиксина В при терапии экспериментального синегнойного сепсиса у мышей линии BALB/c (n = 10), вызванного внутрибрюшинным введением культур *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* B1304 в дозе 10 ЛД₅₀.

Группа	Выжившие, %	Санитарованные, %	Носители <i>P. aeruginosa</i> , %	Количество клеток <i>P. aeruginosa</i> PAO1, LOG 10 КОЕ/г (мл)*			
				селезенка	печень	легкие	кровь
<i>P. aeruginosa</i> PAO1							
PA5, профилактика	100	100	0	0 (10/10)**	0 (10/10)	0 (10/10)	0 (10/10)
PA5, лечение	80	40	40	$4,8 \pm 1,6$ (4/8)	$4,4 \pm 1,7$ (4/8)	0 (8/8)	0 (8/8)
Полимиксин	100	100	0	0 (10/10)	0 (10/10)	0 (10/10)	0 (10/10)
<i>P. aeruginosa</i> B1304							
PA5, профилактика	100	100	0	0 (10/10)**	0 (10/10)	0 (10/10)	0 (10/10)
PA5, лечение	70	70	0	0 (7/7)	0 (7/7)	0 (7/7)	0 (7/7)
Полимиксин	100	100	0	0 (10/10)	0 (10/10)	0 (10/10)	0 (10/10)

*Среднее значение и стандартное отклонение.
 **Соотношение количества мышей с данным результатом бактериологического анализа к общему числу выживших животных.

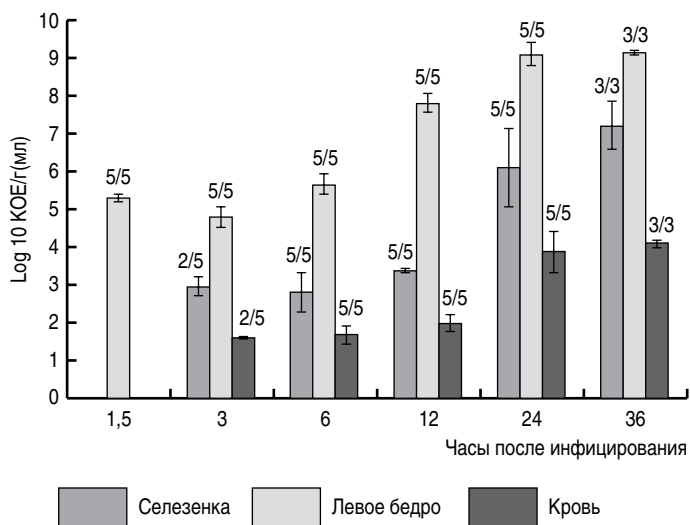


Рис. 3. Диссеминация клеток *P. aeruginosa* B1304 в организме мышей после внутрибрюшинного введения в дозе 30 ЛД₅₀. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения концентрации синегнойной палочки в селезенке, мышцах левого бедра и крови инфицированных мышей линии BALB/c. В дробки указано соотношение количества мышей с положительным бактериологическим результатом к общему числу животных в группе.

обсемененность ткани селезенки клетками *P. aeruginosa* B1304 возрастала в среднем до $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г.

Бактериемия появлялась у 40% мышей через 3 ч после инфицирования и постепенно нарастала, достигая максимального уровня к 36 ч – $1,2 \times 10^4$ КОЕ/г.

Эффективность лечения летальной синегнойной инфекции бедра у мышей

Хороший лечебно-профилактический эффект бактериофага PA5, полученный при экспериментальной терапии летального синегнойного сепсиса у мышей, не повторился, фаготерапия инфекции мягких тканей бедра оказалась неэффективной. Все мыши, инфицированные культурой штамма *P. aeruginosa* B1304 в дозе 30 ЛД₅₀ и получавшие бактериофаг PA5 в качестве профилактики (за 1 ч до заражения), умерли в течение 3 сут (рис. 4).

Фаготерапию и антибиотикотерапию синегнойной инфекции бедра у мышей начинали в ранние сроки инфекции, когда возбудитель локализовался только в месте введения (мышцах левого бедра), а бактериемии не наблюдалось. Пятидневный курс лечения фагом PA5 не дал положительного результата: все животные пали ко 2-м суткам наблюдения. Средний срок гибели (ССГ) составил 1,8 сут. При пятидневном подкожном введении препарата бактериофага также наблюдалась гибель 100% животных, но в этом случае ССГ увеличивался до 3,1 сут. Мыши из контрольной группы (без лечения) погибали в течение первых двух дней синегнойной инфекции бедра. Из селезенки, печени, крови и тканей левого бедра всех павших животных была выделена культура синегнойной палочки.

Лечение экспериментальной синегнойной инфекции бедра полимиксином было эффективным. На 14-й день после заражения выживаемость мышей, получавших антибиотик, составила 100%. Бактериологическое исследование печени, селезенки, крови и мягких тканей левого бедра (места введения культуры синегнойной палочки) выживших мышей не выявило культуры *P. aeruginosa* B1304.

Экспериментальная синегнойная инфекция бедра у мышей, вызываемая внутримышечным введением летальной дозы (30 ЛД₅₀) штамма *P. aeruginosa* PAO1, также не поддавалась фаготерапии (рис. 4). Все животные из групп профилактики и лечения умирали в течение 3 сут после заражения, а все контрольные животные погибали в период 24–48 ч. С другой стороны, антибиотикотерапия инфекции дала положительный результат. Через две недели после инфицирования 100% животных оставались живыми и не являлись носителями *P. aeruginosa* PAO1.

Для сравнительного изучения терапевтической эффективности бактериофага PA5 и полимиксина В мы использовали две модели синегнойной инфекции, поскольку *P. aeruginosa* способна вызывать различные патофизиологические изменения в организме хозяина в зависимости от локализации патогена. Мы выбрали модель острого сепсиса и инфекцию мягких тканей бедра, которые заканчиваются быстрой гибелью экспериментальных животных.

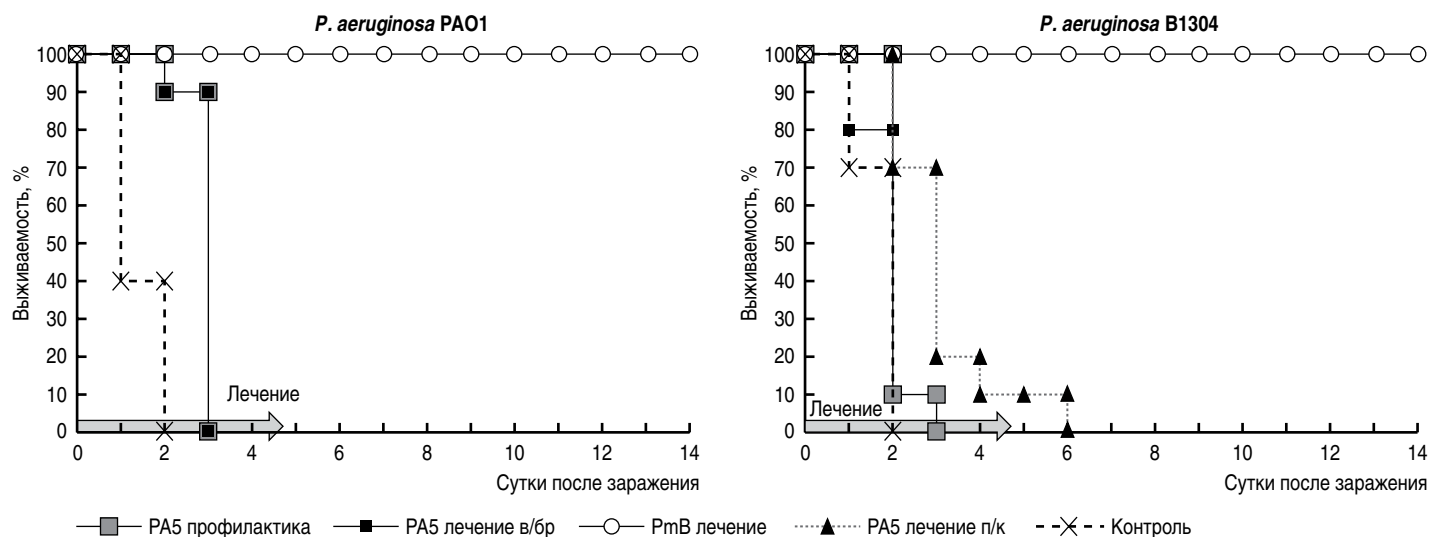


Рис. 4. Лечебная эффективность бактериофага PA5 и полимиксина при профилактике и лечении летальной инфекции у иммунодефицитных мышей BALB/c, вызванной внутримышечным введением 30 ЛД₅₀ культуры *P. aeruginosa*.

Летальные модели инфекции позволяют наглядно оценить активность различных антимикробных препаратов *in vivo* по выживаемости подопытных животных.

В качестве инфекционных агентов использовали широко применяемый штамм *P. aeruginosa* PAO1 и клинический изолят – *P. aeruginosa* B1304. Мышей линии BALB/c заражали культурами этих штаммов в относительно невысоких дозах – 8×10^4 и 6×10^5 КОЕ соответственно, поскольку использовали мышей с повышенной чувствительностью к инфекции, вводя им внутрибрюшинно патоген вместе с муцином, который подавляет активность макрофагов. Таким образом, мы хотели снизить токсическую нагрузку на организм животных в случае высокой антибактериальной активности испытуемых препаратов.

В наших экспериментах мы показали, что бактериофаг PA5, назначаемый внутрибрюшинно в дозе 5×10^8 КОЕ, эффективно защищает животных от гибели как в случае профилактики (однократно за час до заражения), так и при пятидневном лечении (начало терапии через 1,5 ч после заражения). Однако санирующее действие бактериофага PA5 зависело от штамма-возбудителя инфекции. Все выжившие животные, зараженные культурой *P. aeruginosa* B1304, после курса фаготерапии не являлись носителями патогена, а в случае штамма *P. aeruginosa* PAO1 у половины выживших мышей из печени и селезенки была выделена культура возбудителя инфекции (таблица). Yun-Jeong Neo и соавт. [27] также использовали септическую модель синегнойной инфекции для оценки антибактериальной активности литических бактериофагов. При однократном внутрибрюшинном введении иммунокомпетентным мышам фага МРК1 в дозе 2×10^7 БОЕ через 6 ч после внутрибрюшинного заражения культурой *P. aeruginosa* PAO1 100% мышей оставались живыми в течение 48 ч. Интересно, что при внутримышечном введении этого же бактериофага в той же дозе защитный эффект отсутствовал, что свидетельствует о важности выбора пути его введения. Очевидно, что при внутрибрюшинном способе введения фаговые частицы быстрее находят клетки-мишени – синегнойные палочки.

Несмотря на лечебную эффективность бактериофага PA5 при терапии острого сепсиса у мышей, мы не наблюдали положительного результата в случае лечения синегнойной инфекции бедра. Напротив, антибиотик полимиксин, обладающий большей биодоступностью, излечивал подопытных животных с летальной синегнойной инфекцией мягких тканей, вызываемой обоими использованными штаммами *P. aeruginosa*. Возможно, отсутствие положительного результата при фаготерапии бедренной инфекции у мышей связано с плохой проникающей способностью этого фага в мягкие ткани. Ранее на аналогичной модели бедренной *K. pneumoniae*-инфекции нами было установлено, что бактериофаги способны проникать в очаг инфекции и эффективно лизировать культуру возбудителя. Так, например, клебсиеллезный бактериофаг KpV289 при внутрибрюшинном введении мышам (10^8 БОЕ) в режимах профилактики и лечения защищал от гибели 90–100% животных, инфицированных внутримышечно культурой штамма *K. pneumoniae* KPM9 в дозе 100 ЛД50 [22]. Бактериологический анализ органов и тканей выживших животных показал, что под действием бактериофага произошла элиминация клеток *K. pneumoniae* KPM9.

Заключение

Бактериофаг PA5 по лечебно-профилактическому действию близок к высокоактивному антибиотику полимиксину В при терапии летального синегнойного сепсиса. Проведенные эксперименты показали, что однократное внутрибрюшинное введение мышам линии BALB/c фага в режиме профилактики (за 1 ч до заражения) защищает от гибели 100% животных. Пятидневный курс фаготерапии, начатый через 1,5 ч после заражения, защищает от гибели 70–80% мышей, в зависимости от штамма *P. aeruginosa*. Пятидневный курс лечения полимиксином дает 100% лечебный результат.

В отличие от полимиксина, бактериофаг PA5 неэффективен при профилактике и лечении летальной синегнойной инфекции бедра у мышей, что может объясняться низкой проникающей способностью этого фага в мышечную ткань инфицированных животных.

Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

- Gerald P, Bolivar BR, Fainstein V, Jadeja L. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Reviews of Infectious Diseases. 1983;5(2):279-313.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with Healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013 Jan;34(1):1-14. DOI: 10.1086/668770.
- Руднов ВА, Бельский ДВ, Дехнич АВ, Матвеев АС, Гиевская ОЛ, Дрозд АВ, и др. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2011;13(4):294-304.
- Custovic A, Smajlovic J, Hadzic S, Ahmetagic S, Tihic N, Hadzagic H. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. Mater Sociomed. 2014 Feb;26(1):7-11. DOI: 10.5455/msm.2014.26.7-11.
- Richards MJ, Edwards JR, Culver D.H, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. Infect Control Hosp Epidemiol. 2000 Aug;21(8):510-5.
- Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs. 2007;67(3):351-68. DOI: 10.2165/00003495-200767030-00003
- Talwalkar JS, Talwalkar JS, Murray TS. The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Clin Chest Med. 2016 Mar;37(1):69-81. DOI: 10.1016/j.ccm.2015.10.004
- Mogayzel P, Naureckas ET, Robinson KA. Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Clinical Practice Guidelines Committee. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. Pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. Ann Am Thorac Soc. 2014 Dec;11(10):1640-50. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201404-1660C
- Waters V, Smyth A. Cystic fibrosis microbiology: advances in antimicrobial therapy. J Cyst Fibros. 2015 Sep;14(5):551-60. DOI: 10.1016/j.jcf.2015.02.005
- López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. Expert Rev Respir Med. 2015 Feb; 9(1):73-88. DOI: 10.1586/17476348.2015.995640.

11. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen P, Wang H, Hoiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 May;85:7-23. DOI: 10.1016/j.addr.2014.11.017
12. Goodleta KJ, Nicolau DP, Nailora MD. *In Vitro* Comparison of Ceftolozane-Tazobactam to Traditional Beta-Lactams and Ceftolozane-Tazobactam as an Alternative to Combination Antimicrobial Therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Nov 22;61(12). pii: e01350-17. DOI: 10.1128/AAC.01350-17
13. Toufekoula C, Papadakis V, Tsaganos T, Routsis C, Orfanos SE, Kotanidou A, et al. 2013. Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram-negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Crit Care.* 2013 Jan 16;17(1):R6. DOI: 10.1186/cc11930.
14. Воронина ОЛ, Кунда МС, Аветисян ЛР, Чернуха МЮ, Габриэлян НИ, Шагинян ИА, Лунин ВГ. Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов хирургических отделений ФНЦТИО им. В.И.Шумакова. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2012;14(2):88-99.
15. Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Mar;27(3):196-200. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.10.007
16. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol.* 2013 Oct;15(10):2865-78. DOI: 10.1111/1462-2920.12155.
17. Louie A, Liu W, Van Guilder M, Neely MN, Schumitzky A, Jelliffe R, et al. Combination Treatment With Meropenem Plus Levofloxacin Is Synergistic Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Murine Model of Pneumonia. *J Infect Dis.* 2015 Apr 15;211(8):1326-33. DOI: 10.1093/infdis/jiu603
18. Aoki N, Tateda K, Kikuchi Y, Kimura S. Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar;63(3):534-42. DOI: 10.1093/jac/dkn530
19. Vieira A, Silva YJ, Cunha A, Gomes NC, Ackermann HW, Almeida A. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: *in vitro* and *ex vivo* experiments *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov;31(11):3241-9. DOI: 10.1007/s10096-012-1691-x
20. Berchieri A Jr, Lovell MA, and Barrow PA. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* 1991 Jun;142(5):541-9.
21. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun.* 2002 Jan;70(1):204-10.
22. Борзилов АИ, Воложанцев НВ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, и др. Эффективность бактериофага КРV289 при лечении острой пневмонии и инфекции бедра, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, у мышей. *Инфекционные болезни.* 2017;15(3):48-57. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-3-48-56
23. Борзилов АИ, Воложанцев НВ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, и др. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. *Инфекция и иммунитет.* 2017;S:906.
24. Борзилов АИ, Мякина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Веревкин ВВ, Воложанцев НВ. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB_Крпн_КрV289 на модели острого сепсиса у мышей. *Бактериология.* 2017;2(1):73-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77
25. Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Blasi U. Therapy of Experimental *Pseudomonas* Infections with a Nonreplicating Genetically Modified Phage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Oct;48(10):3817-22. DOI: 10.1128/AAC.48.10.3817-3822.2004
26. Vieira A, Silva YJ, Cunha A, Gomes NCM, Ackermann H-W, Almeida A. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: *in vitro* and *ex vivo* experiments. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov; 31(11):3241-9. DOI: 10.1007/s10096-012-1691-x
27. Heo YJ, Lee YR, Jung HH, Lee J, Ko G, Cho YH. Antibacterial Efficacy of Phages against *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2469-74. DOI: 10.1128/AAC.01646-08
28. Lawrenz MB, Biller AE, Cramer DE, Kraenzle JL. Development and evaluation of murine lung-specific disease models for *Pseudomonas aeruginosa* applicable to therapeutic testing. *Pathog Dis.* 2015 Jul;73(5). pii: ftv025. DOI: 10.1093/femspd/ftv025.
29. Drusano GL, Vanscoy B, Liu W, Fikes S. Saturability of granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jun;55(6):2693-5. DOI: 10.1128/AAC.01687-10
30. Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW, Rayner CR, Li J, Nation RL. Elucidation of the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Determinant of Colistin Activity against *Pseudomonas aeruginosa* in Murine Thigh and Lung Infection Models. *Antimicrob. Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1117-24. DOI: 10.1128/AAC.01114-09
31. Dai T, Gupta A, Hamblin MR. Blue Light Rescues Mice from Potentially Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Burn Infection: Efficacy, Safety, and Mechanism of Action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Mar;57(3):1238-45. DOI: 10.1128/AAC.01652-12
32. Craig WA, Andes DR. *In Vivo* Activities of Ceftolozane, a New Cephalosporin, with and without Tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*, Including Strains with Extended-Spectrum β -Lactamases, in the Thighs of Neutropenic Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1577-82. DOI: 10.1128/AAC.01590-12
33. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Seyedmousavi S. Pharmacodynamics of Ceftazidime and Avibactam in Neutropenic Mice with Thigh or Lung Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov 2;60(1):368-75. DOI: 10.1128/AAC.01269-15
34. Sugihara K, Tateda K, Yamamura N, Koga T, Sugihara K. Efficacy of Human-Simulated Exposures of Tomopenem Formerly CS-023) in a Murine Model of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):5004-9. DOI: 10.1128/AAC.00068-11
35. Reyes N, Aggen JB, Kostrub CF, Reyes N. *In Vivo* Efficacy of the Novel Aminoglycoside ACHN-490 in Murine Infection Models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Apr;55(4):1728-33. DOI: 10.1128/AAC.00862-10
36. Pan CY, Chen JC, Sheen JF, Lin TL, Chen JY. Epinecidin-1 Has Immunomodulatory Effects, Facilitating Its Therapeutic Use in a Mouse Model of *Pseudomonas aeruginosa* Sepsis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4264-74. DOI: 10.1128/AAC.02958-14
37. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes et particules de acteriophage. *Ann. Inst. Pasteur.* 1936;57:652.

References

1. Gerald P, Bolivar BR, Fainstein V, Jadeja L. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases.* 1983;5(2):279-313.
2. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with Healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Jan;34(1):1-14. DOI: 10.1086/668770.
3. Rudnov VA, Belsky DV, Dekhnich AV, Matveev AS, Yarustovsky MB, et al. Infections in Russian ICUs: Results of the Nationwide Multicenter Study. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2011;13(4):294-304. (In Russian).

4. Custovic A, Smajlovic J, Hadzic S, Ahmetagic S, Tihic N, Hadzagic H. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. *Mater Sociomed.* 2014 Feb;26(1):7-11. DOI: 10.5455/msm.2014.26.7-11.
5. Richards MJ, Edwards JR, Culver D.H, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000 Aug;21(8):510-5.
6. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007;67(3):351-68. DOI: 10.2165/00003495-200767030-00003
7. Talwalkar JS, Talwalkar JS, Murray TS. The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Chest Med.* 2016 Mar;37(1):69-81. DOI: 10.1016/j.ccm.2015.10.004
8. Mogayzel P, Naureckas ET, Robinson KA. Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Clinical Practice Guidelines Committee. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. Pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Ann Am Thorac Soc.* 2014 Dec;11(10):1640-50. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201404-1660C
9. Waters V, Smyth A. Cystic fibrosis microbiology: advances in antimicrobial therapy. *J Cyst Fibros.* 2015 Sep;14(5):551-60. DOI: 10.1016/j.jcf.2015.02.005
10. López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. *Expert Rev Respir Med.* 2015 Feb;9(1):73-88. DOI: 10.1586/17476348.2015.995640.
11. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen P, Wang H, Hoiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 May;85:7-23. DOI: 10.1016/j.addr.2014.11.017
12. Goodleta KJ, Nicolaub DP, Nailora MD. *In Vitro* Comparison of Ceftolozane-Tazobactam to Traditional Beta-Lactams and Ceftolozane-Tazobactam as an Alternative to Combination Antimicrobial Therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Nov 22;61(12). pii: e01350-17. DOI: 10.1128/AAC.01350-17
13. Toufekoula C, Papadakis V, Tsaganos T, Routs C, Orfanos SE, Kotanidou A, et al. 2013. Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram-negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Crit Care.* 2013 Jan 16;17(1):R6. DOI: 10.1186/cc11930.
14. Voronina OL, Kunda MS, Avetisyan LR, Chernukha MYu, Gabrielyan NI, Shaginyan IA, Lunin VG. Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Nosocomial Infections in Surgical Wards in Federal Scientific Center of Transplantation and Bioartificial Organs. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2012;14(2):88-99. (In Russian).
15. Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Mar;27(3):196-200. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.10.007
16. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol.* 2013 Oct;15(10):2865-78. DOI: 10.1111/1462-2920.12155.
17. Louie A, Liu W, Van Guilder M, Neely MN, Schumitzky A, Jelliffe R, et al. Combination Treatment With Meropenem Plus Levofloxacin Is Synergistic Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Murine Model of Pneumonia. *J Infect Dis.* 2015 Apr 15;211(8):1326-33. DOI: 10.1093/infdis/jiu603
18. Aoki N, Tateda K, Kikuchi Y, Kimura S. Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar;63(3):534-42. DOI: 10.1093/jac/dkn530
19. Vieira A, Silva YJ, Cunha A, Gomes NC, Ackermann HW, Almeida A. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: *in vitro* and *ex vivo* experiments *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov;31(11):3241-9. DOI: 10.1007/s10096-012-1691-x
20. Berchieri A Jr, Lovell MA, and Barrow PA. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* 1991 Jun;142(5):541-9.
21. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun.* 2002 Jan;70(1):204-10.
22. Borzilov AI, Volozhantsev NV, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, et al. The effectiveness of bacteriophage KpV289 in treatment of acute pneumonia and a hip infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Infekc. bolezni (Infectious diseases).* 2017;15(3):48-57. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-3-48-56 (In Russian).
23. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Abaev IV. Effektivnost' bakteriofaga SA18 pri lechenii eksperimental'noi stafilokokkovoi infektsii u myshei linii BALB/s. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2017;S:906. (In Russian).
24. Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_KpnP_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. *Bacteriology.* 2017;2(1):73-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77 (In Russian).
25. Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Blasi U. Therapy of Experimental *Pseudomonas* Infections with a Nonreplicating Genetically Modified Phage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Oct;48(10):3817-22. DOI: 10.1128/AAC.48.10.3817-3822.2004
26. Vieira A, Silva YJ, Cunha A, Gomes NCM, Ackermann H-W, Almeida A. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: *in vitro* and *ex vivo* experiments. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov;31(11):3241-9. DOI: 10.1007/s10096-012-1691-x
27. Heo YJ, Lee YR, Jung HH, Lee J, Ko G, Cho YH. Antibacterial Efficacy of Phages against *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2469-74. DOI: 10.1128/AAC.01646-08
28. Lawrenz MB, Biller AE, Cramer DE, Kraenzle JL. Development and evaluation of murine lung-specific disease models for *Pseudomonas aeruginosa* applicable to therapeutic testing. *Pathog Dis.* 2015 Jul;73(5). pii: ftv025. DOI: 10.1093/femspd/ftv025.
29. Drusano GL, Vanscoy B, Liu W, Fikes S. Saturability of granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jun;55(6):2693-5. DOI: 10.1128/AAC.01687-10
30. Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW, Rayner CR, Li J, Nation RL. Elucidation of the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Determinant of Colistin Activity against *Pseudomonas aeruginosa* in Murine Thigh and Lung Infection Models. *Antimicrob. Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1117-24. DOI: 10.1128/AAC.01114-09
31. Dai T, Gupta A, Hamblin MR. Blue Light Rescues Mice from Potentially Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Burn Infection: Efficacy, Safety, and Mechanism of Action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Mar;57(3):1238-45. DOI: 10.1128/AAC.01652-12
32. Craig WA, Andes DR. *In Vivo* Activities of Ceftolozane, a New Cephalosporin, with and without Tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*, Including Strains with Extended-Spectrum β -Lactamases, in the Thighs of Neutropenic Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1577-82. DOI: 10.1128/AAC.01590-12
33. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Seyedmousavi S. Pharmacodynamics of Ceftazidime and Avibactam in Neutropenic Mice with Thigh or Lung Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov 2;60(11):368-75. DOI: 10.1128/AAC.01269-15
34. Sugihara K, Tateda K, Yamamura N, Koga T, Sugihara K. Efficacy of Human-Simulated Exposures of Tomopenem Formerly CS-023) in a Murine Model of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):5004-9. DOI: 10.1128/AAC.00068-11

35. Reyes N, Aggen JB, Kostrub CF, Reyes N. *In Vivo* Efficacy of the Novel Aminoglycoside ACHN-490 in Murine Infection Models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Apr;55(4):1728-33. DOI: 10.1128/AAC.00862-10
36. Pan CY, Chen JC, Sheen JF, Lin TL, Chen JY. Epinecidin-1 Has Immunomodulatory Effects, Facilitating Its Therapeutic Use in a Mouse Model of *Pseudomonas aeruginosa* Sepsis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4264-74. DOI: 10.1128/AAC.02958-14
37. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes et particules de acteriophage. *Ann. Inst. Pasteur.* 1936;57:652.

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 360147
E-mail: nikvol@obolensk.org

Информация об авторах:

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: korobova@obolensk.org

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Мякина Вера Павловна, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: myakinina@obolensk.org

Красильникова Валентина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: krasilnikova@obolensk.org

Верёвкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 360147
E-mail: verevkin@obolensk.org

Information about authors:

Olga V. Korobova, PhD (Biol.), senior researcher of the biological testing laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967)360147
E-mail: korobova@obolensk.org

Tatiana I. Kombarova, PhD (Biol.), senior researcher of the biological testing laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 360147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Vera P. Myakinina, researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: myakinina@obolensk.org

Valentina M. Krasilnikova, PhD (Biol.), senior researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: krasilnikova@obolensk.org

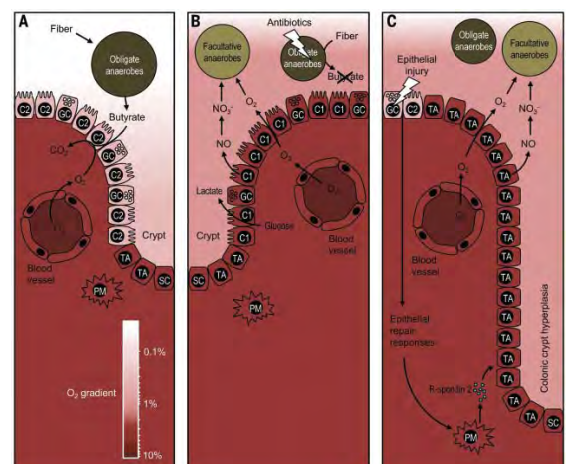
Vladimir V. Verevkin, PhD (Biol.), senior of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: verevkin@obolensk.org

Nikolai V. Volozhantsev, PhD (Biol.), leading researcher, head of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 360147
E-mail: nikvol@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Метаболическая регуляция микробиоты

Микробиота кишечника влияет на здоровье человека, но мы только начинаем понимать взаимодействия между хозяином и микробом. Ученые изучили как эпителиальные клетки толстой кишки опосредуют симбиоз. Здоровые колоноциты поддерживают анаэробные условия в просвете кишечника, поскольку их метаболизм обеспечивает быстрое потребление кислорода. Такие условия селективны для облигатных анаэробных организмов. Как правило, это микроорганизмы, потребляющие пищевые волокна и производящие жирные кислоты с короткой цепью, полезные для хозяина. В случае изменения метаболизма колоноцитов – из-за болезней, диеты или других повреждений – эпителий становится оксигенированным. Присутствие кислорода способствует распространению факультативных аэробных организмов. Патогенные микроорганизмы, часто являются кислородно-толерантными, и результатом может быть дисбиоз.



Использование веб-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» для изучения генома STEC штамма *E. coli* серотипа O101:H33

Н.Н.Карцев, Ю.П.Скрябин, А.А.Кисличкина, А.Г.Богун, М.Е.Канашенко, Н.К.Фурсова, Э.А.Светоч

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

Гибридные (гетеропатогенные) штаммы диареогенных эшерихий, выделяемые от людей и животных, объединяют свойства разных патогрупп *E. coli*, что вызывает трудности в их диагностике и лечении. Такие штаммы представляют повышенную эпидемиологическую опасность, и их изучение является весьма актуальным. Онлайн-ресурс «Center for Genomic Epidemiology» (CGE) позволяет оценить патогенетическое и эпидемиологическое значение бактериальных патогенов, в том числе диареогенных эшерихий.

Анализ генома штамма *E. coli* 13573 O101:H33 с помощью сервиса Virulence Finder 1.5 онлайн-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» позволил установить в нем наличие генетических детерминант, ответственных за продукцию факторов патогенности, таких как глутаматдекарбоксилаза, система секреции третьего типа, сериновая протеаза, фактор повышенной устойчивости к бактерицидному действию сыворотки крови, ауто транспортер сериновой протеазы энтеробактерий (SPATE), интимин, энтерогеомолизин, шига-токсин 2 типа, Non-LEE кодируемый эффектор В, а также термостабильный энтеротоксин *est1a*, что указывает на гибридную природу этого штамма (STEC/EPEC). У данного штамма определен сиквенс-тип – ST330.

Онлайн-ресурс CGE позволяет в короткие сроки определить факторы вирулентности и сиквенс-тип штамма, что может быть крайне важно при изучении вспышечных и спорадических случаев заболеваний эшерихиозами. Полученные данные свидетельствуют о большом генетическом разнообразии факторов патогенности у STEC-штаммов различных серотипов и позволяют глубже понять и объяснить связь генотипа патогена с его потенциальной опасностью для человека и его клинической значимостью для инфекционистов.

Ключевые слова: диареогенные *E. coli*, гибридные штаммы, идентификация, гены вирулентности

Для цитирования: Карцев Н.Н., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Богун А.Г., Канашенко М.Е., Фурсова Н.К., Светоч Э.А. Использование веб-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» для изучения генома STEC штамма *E. coli* серотипа O101:H33. Бактериология. 2019; 4(1): 44–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-44-49

Use of the web-resource «Center for Genomic Epidemiology» for study of the STEC strain genome *Escherichia coli*

N.N.Kartsev, Yu.P.Skryabin, A.A.Kislichkina, A.G.Bogun, M.E.Kanashenko, N.K.Fursova, E.A.Svetoch

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Hybrid strains of DEC combine the properties of different pathogens of *E. coli*, which causes difficulties in their diagnosis and treatment, and also present an increased epidemiological hazard. A new method for conducting epidemiological studies of several relevant bacterial pathogens, including diarrhea, is the online resource Center for Genomic Epidemiology (CGE).

The analysis of the genome of *E. coli* strain 13573 serotype O101:H33 using VirulenceFinder 1.5 online resource Center for Genomic Epidemiology made it possible to establish in it the presence of genetic determinants responsible for the production of pathogenicity factors such as STEC: glutamate decarboxylase, secretion system third type, serine protease, a factor of increased resistance to the bactericidal action of blood serum, an autotransporter of serine protease enterobacteria (SPATE) of intimin, enterohemolysin, step type 2 toxin, and a non-LEE coded effector B and EPEC-gene thermostable enterotoxin *est1a*, indicating that the hybrid nature of this strain (STEC/EPEC). The sequence-type – ST330 of this strain was determined.

The CGE online resource allows the identification of virulence factors and the sequence-type of the strain under investigation, which can be extremely important in the study of outbreaks and sporadic cases of diseases with escherichiosis. The obtained data testify to the great genetic diversity of pathogenicity factors in STEC strains of various serotypes and allow deeper

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: kartsev@obolensk.org

Статья поступила 27.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Nikolay N. Kartsev, PhD (Medicine), researcher of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: kartsev@obolensk.org

The article was received 27.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

understanding and explanation of the association of the pathogen genotype with its potential danger to humans and its clinical significance for infectionists.

Keywords: diarrheagenic *E. coli*, hybrid strains, identification, virulence genes

For citation: Kartsev N.N., Skryabin Yu.P., Kislichkina A.A., Bogun A.G., Kanashenko M.E., Fursova N.K., Svetoch E.A. Use of the web-resource «Center for Genomic Epidemiology» for study of the STEC strain genome *Escherichia coli*. *Bacteriology*. 2019; 4(1): 44–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-44-49

Патогенные штаммы *Escherichia coli* можно разделить на две группы: диареогенные *E. coli* (DEC), вызывающие расстройства желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и *E. coli*, вызывающие внекишечные инфекции у человека и животных (ExPEC), включая сепсис, менингит и инфекцию мочевыводящих путей [1]. Группа DEC включает в себя семь основных патогрупп: энтеропатогенные *E. coli* (EPEC), энтеротоксигенные *E. coli* (ETEC), энтероинвазивные *E. coli* (EIEC), шига-токсин-продуцирующие *E. coli* (STEC), энтероагрегативные *E. coli* (EAgEC), диффузно-адгезивные *E. coli* (DAEC) и адгезивно-инвазивные *E. coli* (AIEC). Кроме того, в последние годы выявляются гибридные патотипы диареогенных эшерихий – энтероагрегативные геморрагические *E. coli* (EAHEC) и шига-токсин-продуцирующие энтеротоксигенные *E. coli* (STEC/ETEC), представляющие определенные трудности в диагностике и лечении инфекций, вызываемых такими штаммами [2, 3].

Как показывают события последних лет, гибридные штаммы DEC представляют повышенную эпидемиологическую опасность [4]. Наиболее ярким примером инфекции, вызванной гибридным DEC штаммом, явилась крупная вспышка острой кишечной инфекции (ОКИ) в Германии в 2011 г., обусловленная мультирезистентным EAHEC серотипа O104:H4, когда инфекцией были поражены более 4000 человек, из которых 54 умерли [5, 6]. В 2009 г. было зарегистрировано 25 случаев гемолитико-уремического синдрома (ГУС) в Грузии. Во время вспышки были выделены два штамма *E. coli* серотипа O104:H4, в которых были определены гены *stx2a*, характерные для EHEC, и гены *aggR* и *aatA*, обнаруживаемые у EAgEC. Оба штамма были устойчивы к ампициллину, стрептомицину, сульфизоксазолу и триметоприм/сульфометоксазолу. Один из них также был устойчив к триметоприму. В отличие от штаммов, выделенных в Германии в 2011 г., данные штаммы не обладали устойчивостью к цефалоспорином III поколения [7]. Спорадические случаи выделения EAHEC *E. coli* O104:H4 от больных с ГУС описаны в Бельгии в 2013 г.: от 42-летней женщины, вернувшейся после отдыха в Тунисе, и от 14-летней девочки спустя неделю после отдыха в Турции. Оба штамма несли основные гены вирулентности STEC и EAgEC, идентичные «германским» штаммам, а именно: *stx2a*, *aggR* и *aaiC* [8]. В литературе описано также выделение штаммов *E. coli* гибридных патогрупп STEC/ETEC от жвачных животных (овцы, козы) в Бангладеш [9], а также от ребенка в Финляндии [3]. Представленные выше материалы свидетельствуют о важности индикации, идентификации и изучения гибридных штаммов для науки и клинической практики.

В последние годы наиболее популярным и востребованным методом изучения бактериальных патогенов является

их полногеномное секвенирование (whole genome sequencing, WGS), используемое как в обычной диагностической практике, так и при ретроспективных исследованиях вспышечных случаев инфекций. Новым ресурсом, позволяющим оценить потенциальную эпидемиологическую опасность ряда актуальных бактериальных патогенов, в том числе диареогенных эшерихий, является онлайн-ресурс «Center for Genomic Epidemiology» (CGE) (www.genomicepidemiology.org) [10, 11].

Онлайн-ресурс CGE призван решить задачу извлечения максимального количества полезной информации из большого массива данных полногеномного секвенирования в сжатые сроки, что позволяет использовать эту информацию для нужд исследователей, эпидемиологов и клиницистов. Для достижения этой цели CGE предоставляет общедоступные и удобные в использовании веб-инструменты для оперативной обработки данных WGS и извлечения соответствующей информации: поиск, идентификация генетических детерминант антибиотикорезистентности – ResFinder, ResFinderFG, KmerResistance; предсказание патогенности бактерий для человека и идентификация генов вирулентности – PathogenFinder, VirulenceFinder, SPIFinder; выявление сайтов рестрикции-модификации – Restriction-ModificationFinder; генотипирование штаммов – MLST, PlasmidFinder, pMLST, KmerFinder, spaTyper, FimTyper, MyDbFinder, MyKmerFinder, DeHumanizer; идентификация штаммов – SpeciesFinder, Reads2Type, Tapir; серотипирование – SeroTypeFinder, SeqSero; филогенетический анализ – CSIPhylogeny, NDtree, snpTree; сборка генома – Velvet Assembly, SPAdes Assembly [12].

Цели исследования – идентификация генов вирулентности и определение сиквенс-типа у энтерогеморрагического штамма *E. coli* серотипа O101:H33 с помощью онлайн-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» (www.genomicepidemiology.org).

Материалы и методы

Штамм *E. coli* 13573 серотипа O101:H33, депонированный в «ГКПМ-Оболensk» под номером В-7615, был выделен из сырого молока во время вспышки геморрагического колита (ГК) и ГУС летом 2013 г. в Санкт-Петербурге [13].

Полногеномное секвенирование штамма *E. coli* 13573 серотипа O101:H33 было осуществлено на платформе Illumina MiSeq с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v2 согласно рекомендациям производителя. Полученные единичные прочтения были собраны в контиги при помощи программы SPAdes 3.9.0. (<http://bioinf.spbau.ru/en/spades>). Выравни-

Таблица 1. Гены вирулентности штамма *E. coli* 13573 серотипа O101:H33

Фактор вирулентности	Идентичность, %	Образец/референс, п.н.	Функция белка	Референс-номер
<i>tir</i>	99,70	1650/1650	Транслоцирующий белок-рецептор интимина	AJ633130
<i>ehxA</i>	99,90	2997/2997	Энтерогемолизин	EF204923
<i>gad</i>	99,89	1401/935	Глутаматдекарбоксилаза	U00096
<i>est1a</i>	94,98	219/219	Термостабильный энтеротоксин ST-1a	AJ555214
<i>nleB</i>	100,00	990/990	Non-LEE кодируемый эффектор В	AF453441
<i>espA</i>	99,83	579/579	Система секреции III типа	AJ633130
<i>espF</i>	100,00	624/624	Система секреции III типа	AJ633130
<i>stx2B</i>	100,00	270/270	Шига-токсин 2, субъединица В, вариант а	AE005174
<i>espl</i>	100,00	4092/4092	Аутотранспорт сериновой протеазы энтеробактерий (SPATE)	AP010958
<i>espP</i>	98,05	3903/3903	Плазмидная внеклеточная сериновая протеаза	GQ259888
<i>iss</i>	97,96	294/294	Повышенная устойчивость к сыворотке крови	CP001509
<i>stx2A</i>	100,00	960/960	Шига-токсин 2, субъединица А, вариант а	AY143336
<i>eae</i>	93,14	2820/1808	Интимин	FM180568
Stx-голотоксины				
<i>stx2</i>	100,00	1241/1241	O157 SF-3573-98, вариант а	AB030484

вание последовательностей ДНК осуществляли с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, США). Определение генетических детерминант вирулентности и «генов домашнего хозяйства» в сборке генома штамма *E. coli* 13573 осуществляли с помощью онлайн-сервисов VirulenceFinder 1.5 и MLST 1.8 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Результаты и обсуждение

Анализ генома штамма *E. coli* 13573 O101:H33 с помощью сервиса VirulenceFinder 1.5 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) онлайн-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» позволил установить в нем наличие генетических детерминант, ответственных за продукцию факторов патогенности, таких как глутаматдекарбоксилаза, система секреции третьего типа, сериновая протеаза, фактор повышенной устойчивости к бактерицидному действию сыворотки крови, аутотранспорт сериновой протеазы энтеробактерий (SPATE) интимина, энтерогемолизина, шига-токсина 2 типа, а также Non-LEE кодируемый эффектор В (табл. 1).

Как следует из таблицы, в геноме штамма *E. coli* 13573 O101:H33 установлено присутствие генов *eae*, *stx2*, *ehxA*, характерных для EHEC, и гена *est1a*, характерного для

ETEC. Интересно, что ген *nleB* более характерен для типичных штаммов патогруппы EPEC (tEPEC) [14].

Необходимо отметить, что ген термостабильного энтеротоксина *est1a* в штамме *E. coli* 13573 является дефектным, так как по сравнению с референс-последовательностью гена *est1a* штамма *E. coli* EC2173 (GenBank AJ555214) он имеет делецию нуклеотида А в положении 147, приводящую к формированию стоп-кодона, а также 10 нуклеотидных замен C10T, T57C, T61A, C62A, A64G, C73G, G105C, G118A, C162T, C200T, приводящих к аминокислотным заменам: Ser21Lys, Tre22Ala, Leu25Val, Glu35Asp, Asp40Asn, Lys49Asn, Ser50Gln, Glu51Lys и Asn52Ile. Полностью идентичная структура гена *est1a* описана у гибридного штамма STEC/ETEC IH53473 серотипа O101:H33 в работе O.Nyholm и соавт., 2015 [3] (рисунок).

Таким образом, присутствие в геноме *E. coli* 13573 O101:H33 набора факторов вирулентности представителей двух патогрупп: STEC – генов *eae*, *stx2a*, *ehxA* и ETEC – гена *est1a* указывает на гибридную природу этого штамма. Происхождение подобных гибридных штаммов и их роль в патогенезе заболеваний, вызываемых ими, на сегодня до конца не выяснены.

Для дальнейшей характеристики штамма STEC 13573 был использован метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). MLST-анализ штамма *E. coli* 13573 O101:H33 по схеме базы данных «MLST Databases at UoW» с использованием сервиса MLST 1.8 онлайн-ресурса CGE позволил отнести этот штамм к сиквенс-типу ST330 (ST комплекс 10). Следует отметить, что до нашего исследования сиквенс-тип ST330 был представлен в этой базе данных всего двумя штаммами: одним STEC-штаммом *E. coli* 3311 и одним гетеропатогенным UPEC-штаммом *E. coli* ABU 10084/97. Как и штамм *E. coli* серотипа O101:H33, исследованный нами, штамм ABU 10084/97 продуцировал шига-токсин типа 2 и интимин, но при этом являлся возбудителем инфекции мочевыводящих путей у человека [15]. Сиквенс-тип ST330 также был определен у гибридного штамма STEC/ETEC серотипа O101:H33 в работах O.Nyholm и соавт., 2015 [3].

В связи с вышеизложенным можно сделать предположение, что сиквенс-тип ST330, принадлежащий к ST-комплексу 10, является характерным для гибридных гетеропатогенных штаммов *E. coli*. Здесь же следует заметить, что к ST-комплексу 10 относятся штаммы ETEC серотипа O101:K30:K99

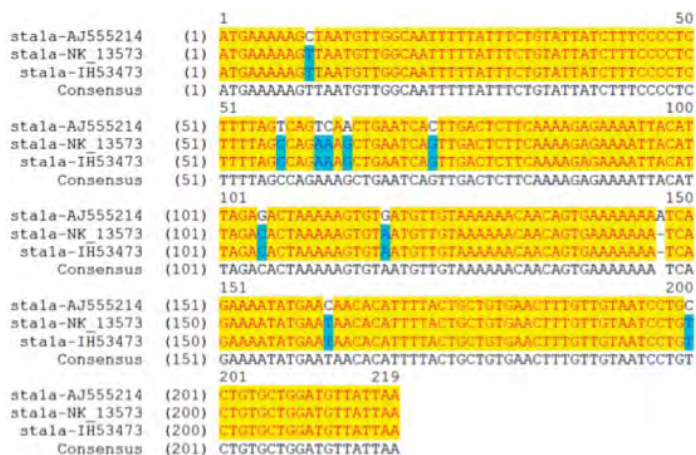


Рисунок. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *est1a* штаммов *E. coli* EC2173, *E. coli* 13573 и *E. coli* IH53473.

Таблица 2. Характеристика штаммов *E. coli*, относящихся к сиквенс-типу ST330, серогруппе O101, серотипу O101:H33 либо с неопределенными серотипами, депонированных в базе данных MLST «Enterobase»

Штамм	Сиквенс-комплекс	Сиквенс-тип	Источник выделения	Год	Город	Страна	Патотип	Серотип/Серогруппа	Заболевание	Автор
B-7615/ NK_13573*	ST10 Cplx	330	Молоко	2013	Санкт-Петербург	Российская Федерация	ЕНЕС	O101:H33	Гемоколит	Н.Н.Карцев
B-7614/ NK_85-50*	ST10 Cplx	330	Фекалии	2013	Санкт-Петербург	Российская Федерация	ЕНЕС	O101:H33	Гемоколит	Н.Н.Карцев
ABU 10084/97	ST10 Cplx	330	Человек		НД	Германия	UPEC	НД	ABU	U.Dobrindt
3311	ST10 Cplx	330	Домашний скот	НД	НД	Англия	STEC	НД	НД	НД
490	ST10 Cplx	10	Корова	1984	Онтарио	Канада	ETEC	O101:K30:K99	Диарея	C.Gyles
505	ST10 Cplx	10	Корова	1982	Онтарио	Канада	ETEC	O101:K28:K99	Диарея	C.Gyles
M613	ST10 Cplx	10	Корова	1996	Онтарио	Канада	ETEC	O101:K30:K99	Диарея	C.Gyles
H131720388	ST10 Cplx	10	Человек	2013	НД	Великобритания	EAEC	O101:H5	Диарея	Chattaway
1116	ST10 Cplx	10	Человек	2007	НД	Бангладеш	EAEC	H33	Диарея	Chattaway
IMT2105	НД	117	Домашняя птица	1999	НД	Германия	APEC	O101:K32:H-	Септицемия	L.Wieler, C.Ewers
2392-1	ST165 Cplx	382	Человек	НД	НД	Бразилия	EPEC	O101:H33	Диарея	Gomes
Ecl1	НД	693	Человек	НД	НД	Индия	Unknown	O101	Инфекция МВП	НД
IMT14112	НД	744	Индейка	2007	НД	Германия	APEC	O101:Hn.t.	Колибациллез	НД
CG57	НД	762	Корова	1984	Онтарио	Канада	ETEC	O101:K28:K99:NM	Диарея	C.Gyles
ED53	ST10 Cplx	10	Свинья	1993	НД	Италия	ЕНЕС	O101:H-	НД	H.Karch
KTE71	ST10 Cplx	330	Человек	2010	НД	Дания	НД	НД	НД	Broad Institute
PNUSAE003642	ST10 Cplx	330	НД	НД	НД	США	НД	НД	НД	CDC
207516	ST10 Cplx	330	Человек	2016	НД	Великобритания	НД	O101:H33	НД	Public Health England

НД – нет данных; * – название штаммов в базах данных «MLST Databases at UoW» и «Enterobase».

(сиквенс-тип ST10), выделенные от телят в Канаде в 1982–1996 гг., а также штаммы ЕНЕС серотипа O101:H- и EAгЕС серотипа O101:H5, выделенные от свиней и человека в Италии и Великобритании соответственно (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) (табл. 2). На дату 03.05.2017 г. в базе данных «Enterobase» (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) аннотированы еще три штамма *E. coli* сиквенс-типа ST330, выделенные в Дании, США и Великобритании, последний из которых относится к серотипу O101:H33. Эти факты указывают на генетическую лабильность штаммов *E. coli* серогруппы O101, которая обеспечивает их принадлежность к различным патогруппам. Изучение генетических особенностей гетеропатогенных (гибридных) штаммов *E. coli*, их вирулентного потенциала и филогенетических связей позволяет, на наш взгляд, глубже понять эволюционные механизмы формирования патогенных биологических агентов и, возможно, предсказывать появление новых вариантов эшерихий, патогенных для человека и животных, а также своевременно разрабатывать средства их диагностики.

Полученные данные свидетельствуют о большом генетическом разнообразии факторов патогенности у STEC-штаммов различных серотипов и позволяют глубже понять и объяснить связь генотипа патогена с его потенциальной опасностью для человека и его клинической значимостью для инфекционистов. Обнаружение у больных геморрагическим колитом STEC-штаммов новых серо- и генотипов ука-

зывает на необходимость проведения более углубленных исследований этиологической структуры ГК, обращая более пристальное внимание на другие, не-O157 STEC-серогруппы, циркулирующие на территории РФ.

Онлайн-ресурс CGE позволяет в короткие сроки определить факторы вирулентности и сиквенс-тип изучаемого штамма, что может быть крайне важно при изучении вспышечных и спорадических случаев заболеваний эшерихиозами.

Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

1. Kaper JB, Nataro JP, Molby H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40. DOI: 10.1038/nrmicro818
2. Fratamico PM, DebRoy C, Needleman DS. Editorial: Emerging Approaches for Typing, Detection, Characterization, and Traceback of *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2016 Dec 27;7:2089. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02089
3. Nyholm O, Halkilahti J, Wiklund G, Okeke U, Paulin L, Auvinen P, Siitonen A. Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains. PLoS One. 2015 Aug 27;10(8):e0135936. DOI: 10.1371/journal.pone.0135936
4. Karch H, Denamur E, Dobrindt U, Finlay BB, Hengge R, Johannes L, et al. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4

- outbreak. EMBO Mol Med. 2012 Sep;4(9):841-8. DOI: 10.1002/emmm.201201662
5. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Макарова МА, Забровская АВ, Сужаева ЛВ, Артамонова ЮА. Вспышки острой кишечной инфекции, вызванные *Escherichia coli* O104:H4, зарегистрированные в странах Европы, и биологические особенности возбудителя. Вестник Санкт-Петербургского университета. 2011;11(4):119-26.
 6. Soon JM, Seaman P, Baines RN. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. Int J Hyg Environ Health. 2013 Jun;216(3):346-54. DOI: 10.1016/j.ijheh.2012.07.005
 7. Chokoshvili O, Lomashvili K, Malakmadze N, Geleishvili M, Brant J, Imnadze P, et al. Rush Investigation of an outbreak of bloody diarrhea complicated with hemolytic uremic syndrome. J Epidemiol Glob Health. 2014 Dec;4(4):249-59. DOI: 10.1016/j.jegh.2014.03.004
 8. De Rauw K, Vincken S, Garabedian L, Levchenko E, Hubloue I, Verhaegen J, et al. Enterohemorrhagic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4 in Belgium and Luxembourg. New Microbes New Infect. 2014 Sep;2(5):138-43. DOI: 10.1002/nmi.258
 9. Johura F-T, Parveen R, Islam A, Sadique A, Rahim MN, Monira S, et al. Occurrence of Hybrid *Escherichia coli* Strains Carrying Shiga Toxin and Heat-Stable Toxin in Livestock of Bangladesh. Front Public Health. 2017 Jan 9;4:287. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00287
 10. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. PLoS One. 2011;6(7):e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751
 11. Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a Legionella outbreak. BMJ Open. 2013 Jan 9;3(1). pii: e002175. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-002175.
 12. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1501-10. DOI: 10.1128/JCM.03617-13
 13. Онищенко ГГ, Дятлов ИА, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Баннов ВА, Карцев НН, и др. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 г. Вестник ПамН. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234
 14. Salvador FA, Hernandez RT, Vieira MAM, Rockstroh AC, Gomes TAT. Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in enteropathogenic *Escherichia coli*. Braz J Microbiol. 2014 Oct 9;45(3):851-5. DOI: 10.1590/s1517-83822014000300014
 15. Toval F, Schiller R, Meisen I, Putze J, Kouzel IU, Zhang W, et al. Characterization of Urinary Tract Infection-Associated Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Infect Immun. 2014 Nov;82(11):4631-42. DOI: 10.1128/IAI.01701-14
 - outbreak. EMBO Mol Med. 2012 Sep;4(9):841-8. DOI: 10.1002/emmm.201201662
 5. Kaftyreva LA, Egorova SA, Makarova MA, Zabrovskaya AV, Suzhayeva LV, Artamonova YuA. Outbreaks of acute enteric infection caused by *Escherichia coli* O104:H4, reported in European countries and biological characteristics of this pathogen. Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine. 2011;11(4):119-26. (In Russian).
 6. Soon JM, Seaman P, Baines RN. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. Int J Hyg Environ Health. 2013 Jun;216(3):346-54. DOI: 10.1016/j.ijheh.2012.07.005
 7. Chokoshvili O, Lomashvili K, Malakmadze N, Geleishvili M, Brant J, Imnadze P, et al. Rush Investigation of an outbreak of bloody diarrhea complicated with hemolytic uremic syndrome. J Epidemiol Glob Health. 2014 Dec;4(4):249-59. DOI: 10.1016/j.jegh.2014.03.004
 8. De Rauw K, Vincken S, Garabedian L, Levchenko E, Hubloue I, Verhaegen J, et al. Enterohemorrhagic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4 in Belgium and Luxembourg. New Microbes New Infect. 2014 Sep;2(5):138-43. DOI: 10.1002/nmi.258
 9. Johura F-T, Parveen R, Islam A, Sadique A, Rahim MN, Monira S, et al. Occurrence of Hybrid *Escherichia coli* Strains Carrying Shiga Toxin and Heat-Stable Toxin in Livestock of Bangladesh. Front Public Health. 2017 Jan 9;4:287. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00287
 10. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. PLoS One. 2011;6(7):e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751
 11. Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a Legionella outbreak. BMJ Open. 2013 Jan 9;3(1). pii: e002175. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-002175.
 12. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1501-10. DOI: 10.1128/JCM.03617-13
 13. Onishchenko GG, Dyatlov IA, Svetoch EA, Volozhantsev NV, Bannov VA, Kartsev NN, et al. Molecular-genetic Characterization of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Isolated During a Food-Borne Outbreak in St. Petersburg in 2013. Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk (Annals of the Russian academy of medical sciences). 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234 (In Russian).
 14. Salvador FA, Hernandez RT, Vieira MAM, Rockstroh AC, Gomes TAT. Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in enteropathogenic *Escherichia coli*. Braz J Microbiol. 2014 Oct 9;45(3):851-5. DOI: 10.1590/s1517-83822014000300014
 15. Toval F, Schiller R, Meisen I, Putze J, Kouzel IU, Zhang W, et al. Characterization of Urinary Tract Infection-Associated Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Infect Immun. 2014 Nov;82(11):4631-42. DOI: 10.1128/IAI.01701-14

References

Информация о соавторах:

Скрябин Юрий Павлович, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: skryabin@obolensk.org

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, заведующий отделом коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора»
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Канашенко Мария Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: fursova@obolensk.org

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: svetoch@obolensk.org

Information about co-authors:

Yuri P. Scryabin, researcher of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: skryabin@obolensk.org

Angelina A. Kislichkina, PhD (Biology), senior researcher of the collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Aleksander G. Bogun, PhD (Biology), leading researcher of the collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: bogun62@mail.ru

María E. Kanashenko, junior research of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biology), leading researcher of antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: fursova@obolensk.org

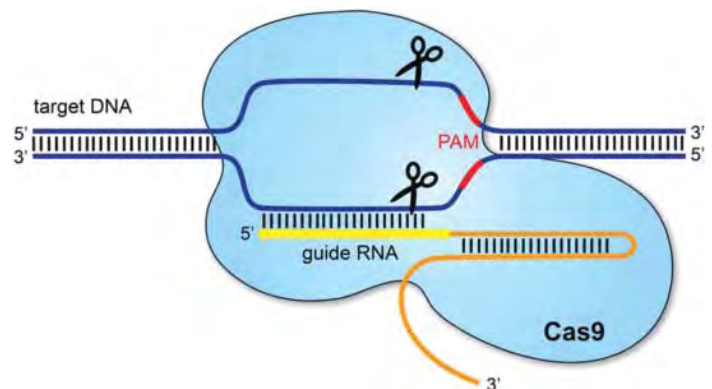
Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary), professor, Chief Researcher of antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: svetoch@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Новые диагностические инструменты CRISPR-Cas

Открытие новых систем CRISPR-Cas обеспечило захватывающие возможности для инноваций за последние несколько лет. Продолжение исследований вновь открытых систем, несомненно, позволит обнаружить более полезные ферменты, которые могут быть использованы для улучшения чувствительности или стабильности современных диагностических инструментов. Тем не менее инструменты могут быть уже достаточно зрелыми для реализации и клинических испытаний. Возможность использования этих типов тестов для быстрой диагностики может оказать огромное влияние в местах оказания медицинской помощи, включая раннее обнаружение вирусных вспышек для обеспечения своевременного реагирования общественно-го здравоохранения.

Как и при редактировании генома, эти новые диагностические инструменты CRISPR-Cas готовы революционизировать доступность быстрой, чувствительной и точной диагностики инфекционных и генетических заболеваний для людей во всем мире.



Sashital D.G.
Pathogen detection in the CRISPR-Cas era.
Genome Medicine. 2018;10(1):32.

Межродовая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака

Е.А.Меньшикова, Е.М.Курбатова, С.О.Водопьянов, С.В.Титова, А.В.Миронова

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

В статье приведены данные по изучению влияния температуры на межродовую конкуренцию *Vibrio cholerae* и представителя аутохтонной микрофлоры поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону *Aeromonas hydrophila* на хитине речного рака. Большинство исследований посвящено изучению моновидовой биопленки, в то время как в природе, как правило, в биопленках сосуществуют несколько видов микроорганизмов в виде единого сообщества.

Для оценки способности холерных вибрионов преодолевать антагонизм со стороны конкурирующего штамма при формировании сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака был разработан доступный метод определения коэффициента ингибции (КИ), основанный на конкурентной активности холерных вибрионов при совместном культивировании с аутохтонной микрофлорой поверхностных водоемов как в планктонной форме, так и в составе биопленок. С помощью этого метода установили, что при 10°C холерные вибрионы не способны конкурировать с гетерологичным штаммом и образовывать биопленку на хитиновом панцире речного рака. В условиях, моделирующих весеннюю температуру в водоемах (15°C), холерные вибрионы преодолевали антагонистическое действие конкурентного штамма при формировании сложной биопленки и в планктонной форме. При температуре 28°C *V. cholerae* способны подавлять штамм-конкурент при формировании биопленки как на поверхности хитина, так и в супернатантах над хитиновыми пластинами. Повышением температуры воды поверхностных водоемов и, как следствие, возрастанием антагонистической активности холерных вибрионов при межродовой конкуренции, вероятно, можно объяснить тот факт, что холерные вибрионы теперь можно обнаружить в тех областях, где они ранее не выделялись.

Ключевые слова: коэффициент ингибции, хитиновый панцирь, биопленка, температура среды культивирования, холерный вибрион

Для цитирования: Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Титова С.В., Миронова А.В. Межродовая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака. Бактериология. 2019; 4(1): 50–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-50-53

Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of *Vibrio cholerae* and autochthonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish

E.A.Menshikova, E.M.Kurbatova, S.O.Vodopyanov, S.V.Titova, A.V.Mironova

Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

The article presents data on the effect of temperature on the intergeneric competition of *Vibrio cholerae* and the representative of the autochthonous microflora of surface water bodies of the city of Rostov-on-Don *Aeromonas hydrophila* on chitin of crayfish. Most studies are devoted to the study of monovid biofilms, while in nature, as a rule, several types of microorganisms coexist in biofilms as a single community.

To assess the ability of *Vibrio cholerae* to overcome antagonism from a competing strain in the formation of a complex biofilm on the chitinous shell of a crayfish, an accessible method was developed for determining the competitive activity (inhibition rate) of *Vibrio cholerae* when co-cultivated with surface autochthonous microflora in both planktonic form and in composition biofilms. Using this method, it was established that at 10°C, *Vibrio cholerae* are not able to compete with the heterologous strain and form a biofilm on the chitinous shell of crayfish. Under conditions simulating spring temperature in water bodies (15°C), *Vibrio cholerae* overcame the antagonistic action of a competitive strain in the formation of a complex biofilm and in planktonic form. At a temperature of 28°C, *V. cholerae* is capable of suppressing a competing strain in the formation of a biofilm both on the surface of chitin and in the supernatants above the chitinous plates. The increase in water temperature in surface water bodies

Для корреспонденции:

Меньшикова Елена Аркадьевна, руководитель группы, старший научный сотрудник экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9108
E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

Статья поступила 17.02.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Elena A. Menshikova, head of the *V. cholerae* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9108
E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

The article was received 17.02.2019, accepted for publication 25.03.2019

and, as a result, an increase in the antagonistic activity of *Vibrio cholerae* during intergeneric competition, explains the fact that *Vibrio cholerae* can now be found in areas where they have not previously been identified.

Keywords: inhibition coefficient, chitin shell, biofilm, temperature of culture medium, *Vibrio cholerae*

For citation: Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Vodopyanov S.O., Titova S.V., Mironova A.V. Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of *Vibrio cholerae* and autokhtonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish. Bacteriology. 2019; 4(1): 50–53. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-50-53

На сегодняшний день известно, что большинство бактерий существуют в природе как в виде отдельных клеток, так и в виде специфически организованных комплексов со сложной трехмерной архитектурой и ярко выраженной коммуникацией – биопленок. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина [1, 2].

Способность холерных вибрионов образовывать биопленки привлекает внимание ученых у нас в стране и за рубежом. Однако механизмы, поддерживающие существование эндемичных по холере территорий, пока полностью не определены [3–5]. Одним из важнейших свойств вибрионов является их способность противостоять неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе меж- и внутривидовой конкуренции. Попадая в окружающую среду, вибрионы взаимодействуют прежде всего с микробным сообществом, которое является первичным звеном любых биоценозов и экосистем. Большинство исследований посвящено изучению моновидовой биопленки, в то время как в биопленках естественного происхождения сосуществуют несколько видов микроорганизмов в виде единого сообщества. Установлено, что в биопленке физиологические процессы бактерий (продукция метаболитов и биологически активных веществ) отличаются от таковых в чистых планктонных культурах бактерий [6, 7]. Взаимодействие между микроорганизмами в биопленке может носить как антагонистический (конкуренция за питательные вещества), так и синергический характер [8, 9]. Следует отметить, что влияние абиотических и биотических факторов на формирование холерным вибрионом биопленки и их взаимоотношения с различными представителями водной биоты до настоящего времени изучены недостаточно, так как любое изменение одного из этих факторов может существенно влиять на структуру и динамику сообщества биопленки.

Целью работы явилось изучение влияния температуры на формирование сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака и межродовую конкуренцию *V. cholerae* с представителем аутохтонной микрофлоры поверхностных водоемов.

Материалы и методы

Для изучения влияния температуры на образование сложной биопленки холерными вибрионами и аутохтонной микрофлорой поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону был разработан простой и удобный метод на хитине речного рака *Astacus astacus*. Метод отвечает всем требованиям биологической безопасности [10].

В работе использовали штаммы *V. cholerae* El Tor P-19613 *ctxAB*⁺ (2014 г.), P-20000 *ctxAB*⁻ (2016 г.), *V. cholerae*

nonO1/nonO139 P-30 *ctx*⁻ (2017 г.) и штамм *Aeromonas hydrophila*, изолированные из рек Дон и Темерник г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинговых исследований проб воды.

Суточные культуры холерных вибрионов и *A. hydrophila*, выращенные на агаре Мартена pH 7,4 ± 0,2 при температуре 37°C, суспендировали в физиологическом растворе pH 7,2 и засеивали в равных количествах в 30 мл стерильной речной воды, содержащей фрагменты хитинового панциря речного рака размером 0,5 × 0,5 см и весом 100 ± 0,2 мг до конечной концентрации 104 м.к./мл. В качестве контролей использовали монокультуры в тех же концентрациях и условиях. Опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды (10°C – осень, 15°C – весна и 26–28°C – лето).

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагменты хитина извлекали стерильным пинцетом, промывали физиологическим раствором от несвязавшихся клеток и вносили в стандартные пробирки эппендорф емкостью 1,5 мл с 1,0 мл физраствора. Для подсчета вибрионов в планктонной форме методом ПЦР отбирали по 300 мкл супернатанта над хитиновыми фрагментами. Лизис клеток биопленки проводили путем прогревания в течение 30 мин при 99°C на термостате «Термит». Полученные препараты использовали для постановки ПЦР в формате реального времени со специфическими праймерами к гену *hlyA* [11]. Учет реакции проводили по наличию или исчезновению полосы специфического ампликона, характерного для каждого штамма вибрионов. Наличие/отсутствие роста исследуемых штаммов параллельно подтверждали бактериологическим методом, используя методику истощающих отпечатков хитиновых пластинок на поверхности плотных питательных сред. Высевы проводили ежедневно в течение первой недели, затем один раз в неделю в течение 28 сут (период наблюдения).

Результаты и обсуждение

Для оценки способности холерных вибрионов преодолевать антагонизм со стороны конкурирующего штамма при формировании сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака нами был введен показатель «коэффициент ингибиции» (КИ), который рассчитывали как отношение количества копий ДНК исследуемого штамма *V. cholerae* в присутствии гетерологичного штамма-конкурента в составе сложной биопленки к количеству копий ДНК того же штамма холерных вибрионов, культивируемого как монокультура. Аналогично рассчитывали КИ холерных вибрионов в планктоне. В условиях, моделирующих температуру воды осенью в водоемах г. Ростова-на-Дону (10°C), установили, что КИ нетоксигенного штамма холерных вибрионов в био-

Таблица. Коэффициент ингибции при формировании сложной биопленки *V. cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака и в планктоне

№ штамма и наличие <i>ctx</i> -гена	t, °C	Время инкубации, сут					
		1	3	6	14	21	28
<i>V. cholerae</i> El Tor P-20000 (<i>ctx</i> ⁻) + <i>A. hydrophila</i>	10	0,5/0,3	0,3/0,41	0,5/0,4	0,5/0,06	0,25/0,05	–
	15	0,6/0,5	0,45/1,6	0,4/4,0	0,9/0,8	1,7/1,4	1,7/0,9
	28	2,3/1,3	1,6/0,3	2,5/2,9	1,7/1,3	1/1,6	1,5/1,1
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 №30 (<i>ctx</i> ⁻) + <i>A. hydrophila</i>	10	0,2/0,2	0,6/0,41	0,6/0,42	0,1/0,5	0,1/0,02	–
	15	5,4/7,5	3/4,4	3/1,4	3/3,8	3/3,7	5,7/23
	28	1,5/3,5	3/0,5	1,4/3,6	0,7/6	2,3/4,4	1,5/3,5
<i>V. cholerae</i> El Tor P-19613 (<i>ctx</i> ⁺) + <i>A. hydrophila</i>	10	0,08/0,06	0,08/0,58	0,28/0,82	0,28/0,11	0,10/0,06	–
	15	0,03/0,13	0,04/0,06	0,05/0,07	0,09/1,33	0,30/0,01	0,14/0,21
	28	2,3/1,4	1,6/0,03	2,5/3	1,7/1,3	1/1,6	1,5/1,4

«→» ДНК *V. cholerae* не обнаружено. БП – биопленка; ПЛ – планктон.

пленке на 21-е сутки культивирования уменьшился в 2 раза, в планктонной форме – в 6 раз по сравнению с исходной концентрацией в опытных пробах. При высеве на агаровые среды установили, что в супернатантах над хитином штаммы холерных вибрионов перестали высеваться на 8-е, а в отпечатках хитиновых пластин на плотных питательных средах – на 14-е сутки. В то же время, по данным ПЦР, специфическая ДНК в этих пробах сохранялась до 21 дня. Возможным объяснением данного факта является переход вибрионов в этот период в некультивируемое состояние [12]. В контрольной пробе (моновидовая биопленка) единичные колонии в отпечатках хитиновых пластин на плотных питательных средах сохранялись до 17 сут, в планктоне – до 14 сут соответственно.

Концентрация гетерологичного штамма *A. hydrophila* как в контрольной, так и в опытной пробе оставалась на уровне $n \times 10^6$ – 10^7 КОЕ/мл в планктоне и в биопленке соответственно весь срок наблюдения (28 дней).

В условиях, моделирующих температуру воды в водоемах весной (15°C), холерные вибрионы были способны конкурировать с *A. hydrophila* при формировании сложной биопленки. КИ холерных вибрионов к 28-м суткам культивирования в сложной биопленке на хитине речного рака увеличился у *ctxAB*⁺ с 0,03 (1-е сутки) до 0,14 (28-е сутки), *ctxAB*⁻ – с 0,6 до 1,7 и *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctx*⁻ – с 5,4 до 5,7. В супернатантах над хитином КИ токсигенного штамма был выше, чем в биопленке, и увеличился от 0,13 до 0,21 соответственно; у нетоксигенного штамма был ниже, чем в биопленке: от 0,5 в первые сутки до 0,9 на 28-е сутки. У холерных вибрионов неO1/неO139 КИ в планктонной форме увеличился от 7,5 до 23. Концентрация *A. hydrophila* к 28-м суткам культивирования уменьшилась и составляла 1×10^3 КОЕ/мл в планктоне и в биопленке против 1×10^7 КОЕ/мл в контрольной пробе.

В условиях, моделирующих температуру водоемов в реках Дон и Темерник летом (28°C), на хитиновых пластинах и в супернатанте над хитином холерные вибрионы на 14-е сутки совместного культивирования практически полностью подавили рост *A. hydrophila*. В контрольных пробах (без присутствия холерных вибрионов) концентрация *A. hydrophila* сохранялась на одном уровне с незначительными изменениями в пределах одного порядка (10^6 – 10^7 м.к./мл) весь период наблюдения. КИ штаммов *V. cholerae* O1 как в биопленке, так и в планктоне к концу периода наблюдения или оставался на уровне первоначальных значений, или не-

значительно снижался (таблица). Снижение КИ в обеих формах существования холерных вибрионов, возможно, объясняется отсутствием штамма-конкурента в среде культивирования, что подтверждалась бактериологическими посевами.

Таким образом, разработан доступный метод определения конкурентной способности (КИ) холерных вибрионов при совместном культивировании с аутохтонной микрофлорой поверхностных водоемов как в планктонной форме, так и в составе биопленок. Экспериментально установлено, что температура среды культивирования влияла на конкурентоспособность холерных вибрионов в свободной (планктонной) форме и при формировании сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака. При 10°C холерные вибрионы не способны образовывать биопленку на хитиновом панцире речного рака и, соответственно, конкурировать с гетерологичным штаммом. В условиях, моделирующих весеннюю температуру в водоемах (15°C), холерные вибрионы преодолевали антагонистическое действие конкурентного штамма в планктонной форме и при формировании сложной биопленки. При температуре 28°C *V. cholerae* способны подавлять штамм-конкурент при формировании биопленки как на поверхности хитина, так и в супернатантах над хитиновыми пластинами. Долгосрочным повышением температуры воды поверхностных водоемов и, как следствие, возрастанием антагонистической активности холерных вибрионов при межродовой конкуренции объясняется тот факт, что холерные вибрионы теперь можно обнаружить в тех областях, где они ранее не выделялись. Данное наблюдение может объяснить более широкое, глобальное распространение возбудителя холеры за пределы эндемичных регионов.

Полученные нами данные могут быть полезны для прогнозирования эпидемиологической ситуации, так как способность холерных вибрионов колонизировать объекты окружающей среды и преодолевать антагонизм со стороны аутохтонной микрофлоры водоемов может привести к накоплению возбудителя в случае заноса с эндемичных по холере территорий.

Литература

1. Tamayor R, Patimalla B, Camilli A. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 2010 Aug;78(8):3560-9. DOI: 10.1128/IAI.00048-10

2. Burmolle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sorensen SJ. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? Trends Microbiol. 2014 Feb;22(2):84-91. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.004
3. Водопьянов СО, Титова СВ, Водопьянов АС, Олейников ИП, Лысова ЛК. Анализ внутривидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные Науки. 2016;1(189):49-53.
4. Титова СВ, Веркина ЛМ. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(4):238-41. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241
5. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Feb 4;10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330
6. Sun S, Xiang, Q, Tay M, Kjelleberg S, Rice SA, McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. ISME J. 2015 Aug;9(8):1812-20. DOI: 10.1038/ismej.2014.265
7. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev. 2012 Sep;36(5):990-1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x
8. Бухарин ОВ, Немцова НВ. Микробиология биоценозов поверхностных водоемов. Екатеринбург, 2008, 151 с.
9. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. FEMS Microbiol Rev. 2012 Sep;36(5):972-89. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x
10. Сп 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». 2013, 150 с.
11. Водопьянов СО, Титова СВ, Водопьянов АС, Веркина ЛМ, Олейников ИП, Писанов РВ, и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках. Здоровье населения и среда обитания. 2017;3(288):51-4.
12. Casasola-Rodríguez B, Ruiz-Palacios GM, Pilar RC, Losano L, Ignacio MR, Orta de Velásquez MT. Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR based on differential gene expression analysis. FEMS Microbiol Lett. 2018 Aug 1;365(15). DOI: 10.1093/femsle/fny156
6. Sun S, Xiang, Q, Tay M, Kjelleberg S, Rice SA, McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. ISME J. 2015 Aug;9(8):1812-20. DOI: 10.1038/ismej.2014.265
7. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev. 2012 Sep;36(5):990-1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x
8. Бухарин ОВ, Немцова НВ. Микробиология биоценозов поверхностных водоемов. Екатеринбург, 2008, 151 с.
9. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. FEMS Microbiol Rev. 2012 Sep;36(5):972-89. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x
10. SP 1.3118-13 "Safety of work with microorganisms of I–II groups of pathogenicity (danger)". 2013, 150 p. (In Russian).
11. Vodop'yanov S, Titova SV, Vodop'yanov AS, Verkina LM, Oleynikov IP, Pizanov RV, et al. The study of interspecific competition *Vibrio cholerae* in biofilms. Public Health and Life Environment. 2017;3:51-4. (In Russian).
12. Casasola-Rodríguez B, Ruiz-Palacios GM, Pilar RC, Losano L, Ignacio MR, Orta de Velásquez MT. Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR based on differential gene expression analysis. FEMS Microbiol Lett. 2018 Aug 1;365(15). DOI: 10.1093/femsle/fny156

Информация об авторах:

Курбатова Екатерина Михайловна, научный сотрудник группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9108

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2266
E-mail: serge100v@gmail.com

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-7908
E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Миронова Анна Витальевна, лаборант группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9108

Information about authors:

Ekaterina M. Kurbatova, researcher of *V. cholerae* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9108

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of biochemistry of microbes, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-2266
E-mail: serge100v@gmail.com

Svetlana V. Titova, MD, PhD, director of Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-7908
E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Anna V. Mironova, laboratory assistant of *V. cholerae* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9108

References

1. Tamayor R, Patimalla B, Camilli A. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 2010 Aug;78(8):3560-9. DOI: 10.1128/IAI.00048-10
2. Burmolle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sorensen SJ. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? Trends Microbiol. 2014 Feb;22(2):84-91. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.004
3. Vodop'yanov SO, Titova SV, Vodop'yanov AS, Oleinikov IP, Lysova LK. Analysis of Intraspecific Competition in *Vibrio Cholerae* Biofilms. University News. North-Caucasian Region. Natural Sciences Series. 2016;1(189):49-53. (In Russian).
4. Titova SV, Verkina LM. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2016;61(4):238-41. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241 (In Russian).
5. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Feb 4;10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330

Испытания рабочей и защитной одежды из современных материалов для использования в бактериологических лабораториях

Л.В.Чекан, Е.А.Тюрин

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

Рассматривается вопрос испытания и использования новых изделий рабочей и защитной одежды и их элементов для обеспечения биологической безопасности при проведении работ с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности) в бактериологических лабораториях различного уровня защиты. Приведены данные, полученные при испытаниях комплектов рабочей и защитной одежды из современных материалов. Выявлены отрицательные и оценены положительные стороны изделий, предложенных для испытаний. Сделан вывод о возможности применения новой одежды в лабораториях.

Ключевые слова: микроорганизмы, биологическая безопасность, рабочая одежда, защитная одежда, новые материалы

Для цитирования: Чекан Л.В., Тюрин Е.А. Испытания рабочей и защитной одежды из современных материалов для использования в бактериологических лабораториях. Бактериология. 2019; 4(1): 54–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-54-57

Testing of working and protective clothes from modern materials for use in bacteriological laboratories

L.V.Chekan, E.A.Tyurin

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

The issue of testing and using novel work clothing and protective garment as well as their components to assure biosafety in handling I–IV pathogenicity (hazard) group microorganisms in safety-varying bacteriological laboratories is considered. There are results from testing sets of modern material-made clothes. With advantages and disadvantages of the tested clothes taken into consideration, a conclusion on the potential laboratory use of the clothes is made.

Key words: microorganisms, biosafety, working clothes, protective clothing, new materials

For citation: Chekan L.V., Tyurin E.A. Testing of working and protective clothes from modern materials for use in bacteriological laboratories. Bacteriology. 2019; 4(1): 54–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-54-57

Все работы с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности) проводят в бактериологических лабораториях от первого до четвертого уровня защиты по международной классификации (УББ/BSL 1–4) с использованием рабочей и защитной одежды [1, 2]. Комплект рабочей одежды – это набор, состоящий из пижамы или комбинезона, медицинской шапочки, носков, тапочек. Комплект защитной одежды состоит из противочумного халата, косынки (медицинской шапочки или капюшона), средств защиты органов

дыхания (респиратор типа «ШБ-1»), глаз (очки или полнолицевая маска), средств защиты рук (перчатки) и защитной обуви (галоши, сапоги, водонепроницаемые бахилы). При работе с патогенными биологическими агентами (ПБА) в бактериологических лабораториях комплект защитной одежды должен соответствовать уровню биологической опасности, определяемой принадлежностью данного микроорганизма к группе патогенности или опасности, характером выполняемых манипуляций, потенциальной опасностью

Для корреспонденции:

Чекан Лариса Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0016

E-mail: chekan@obolensk.org

Статья поступила 27.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Larisa V. Chekan, senior researcher head of the of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0016

E-mail: chekan@obolensk.org

The article was received 27.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

при работе с неизвестным возбудителем (объем, состояние и концентрация исследуемого материала).

Рабочая и защитная одежда для работы в бактериологических лабораториях на сегодняшний день изготавливается из бязи и является многоразовой. Обеззараживание одежды после использования проводят методами замачивания в растворе дезинфектанта, а также обеззараживанием острым паром или комплексно. После окончания процедуры обеззараживания одним из указанных способов одежду стирают и возвращают в лабораторию для дальнейшего использования.

На момент создания первых противочумных костюмов не было уделено должного внимания такому параметру, как размер пор ткани. У хлопчатобумажных тканей (бязь), применяемых в качестве основного материала для изготовления противочумных костюмов, этот параметр варьирует от 24 до 85 мкм. Размеры клеток микроорганизмов значительно меньше, чем поры хлопковых тканей и, таким образом ПБА могут беспрепятственно проникать в «подкостюмное пространство» через поры хлопчатобумажной ткани. При этом данный материал сам по себе является источником образования механических частиц (ворс), к которым в свою очередь могут прикрепляться клетки ПБА. Это является одной из угроз для здоровья персонала, работающего с ПБА, так как установлено, что частицы размером от 3 до 25 мкм способны переносить микроорганизмы [3].

Современный подход к защите персонала при выполнении работ с ПБА предусматривает разные пути повышения уровня защиты одежды, в том числе предлагается переход на материалы с улучшенными эксплуатационными характеристиками. Новые ткани для изготовления одежды, в последнее время появившиеся на рынке, обладают высокой воздухопроницаемостью и износостойкостью. Материал, из которого изготовлены изделия, обладает водоотталкивающими свойствами, что позволяет обеспечить более надежную защиту персонала от возможного проникновения ПБА под одежду при возникновении аварийной ситуации, в то же время сохраняя комфортность для исследователя при проведении работ.

Ранее были предприняты шаги по созданию защитной одежды из новых материалов для работников бактериологических лабораторий (костюм «Кварц», одноразовые костюмы из разных материалов и др.). Был опыт использования уже имевшихся на рынке вариантов защитной одежды фирмы Du Pont (Tyvek, Tuchem), предназначенных для защиты работников от химических агрессивных жидкостей (например, кислот, щелочей).

Специалисты ООО «Лаборатория Технологической Одежды» (холдинг «Ламинарные системы»), занимающиеся разработкой конструкторских решений и подготовкой к серийному выпуску комплектов защитной одежды нового поколения (одноразового и многоразового использования), в сотрудничестве со специалистами в области биологической безопасности ФБУН ГНЦ ПМБ разработали модели защитной одежды и ее элементов с использованием новых тканей для работы с микроорганизмами I–IV группы патогенности [4]. Комплекты создавались с учетом требований к рабочей и защитной одежде, регламентированных действующими санитарно-эпидемиологическими правилами [1, 2].

Современные комплекты рабочей и защитной одежды должны отвечать общим медико-техническим требованиям нормативно-регламентирующих документов и соответствовать существующим стандартам, определяющим защитные свойства и уровень комфорта. На настоящий момент единого российского стандарта, определяющего требования к защитной одежде для работы в бактериологических лабораториях, в частности, с особо опасными инфекциями, нет. Поэтому разработчики обращались к положениям ряда стандартов, касающихся вопросов определения защитных свойств ткани, для изготовления защитной одежды [4].

Исходя из требований потребителя, изготовители должны обращать внимание на следующие положения при изготовлении рабочей и защитной одежды:

- износостойкость, крепость материалов и надежность в носке. Срок службы зависит от интенсивности эксплуатации и обработки изделий;
- прочность ткани, она должна быть прочной на разрыв, нити для швов – термостойкими или армированными для одежды, которая применяется в сложном производственном процессе;
- комплект рабочей и защитной одежды должен соответствовать условиям климата и сезону;
- рабочая и защитная одежда должны быть эргономичной и удобной в процессе носки с учетом кроя костюма, декорирования, количества карманов, вариантов застежек, что важно для одежды, которая применяется в сложном производственном процессе и соответствует профессиональной области и специфике деятельности;
- рабочая и защитная одежда должна быть устойчивой к усадке или стирке сохранять способность к ремонту и надежность к последующей эксплуатации;
- рабочая и защитная одежда должна быть воздухопроницаемой и гигроскопичной для сохранения комфорта во время работы и сохранности здоровья работника в соответствии с критериями гигиеничности;
- рабочая и защитная одежда должна быть эстетичной.

Работа над созданием современной защитной одежды для работы с микроорганизмами I–IV группы патогенности (опасности) была организована по следующим направлениям:

- исследование эксплуатационных характеристик ткани (улучшенные барьерные свойства по отношению к проникновению микроорганизмов, жидкостей бытового и биологического происхождения, механическому воздействию, износостойкость);
- пошив защитной одежды из выбранной ткани и передача на экспериментальное тестирование;
- исследование рабочих и защитных свойств изделий, представленных на исследование.

Основное внимание было уделено подбору ткани с высокими барьерными свойствами. Была выбрана специализированная антистатическая ткань из микрофиламентных нитей (100% полиэфир с добавлением антистатической нити) с отделкой АКВО (антимикробная кровя- и водоотталкивающая отделка) – LS-T-02 с размером пор 0–0,01 мкм.

В результате проведенной работы и с учетом рекомендаций, полученных нами ранее [4, 5], производителем изготовлены типовые комплекты рабочей и защитной

одежды (противочумные халаты разной модификации, капюшон, шапочка, халат, комбинезон, пижама), которые были переданы специалистам ГНЦ ПМБ для проведения испытаний.

Целью настоящей работы было проведение оценки и анализа свойств изделий и их элементов, изготовленных из ткани с отделкой АКВО. Испытания проводились специалистами ГНЦ ПМБ в реальных условиях работы с ПБА I–IV групп в изолированной и базовой лабораториях, а также при работе с экспериментальными лабораторными животными. После проведения исследований были сделаны соответствующие предложения производителю для серийного выпуска изделий.

Условия проведения испытаний для всех видов готовых изделий и элементов одежды были следующими: работа с ПБА в течение 4–6 ч при постоянном разрежении воздушной среды минус 100–150 Па в «заразной» зоне лаборатории по отношению к внешней среде, повышенной влажности и при использовании рабочих растворов дезинфицирующих средств на основе перекиси водорода и аламинола. После окончания работы изделия обеззараживали одним из приведенных способов или комплексно:

- замачиванием после работы в дезинфицирующем рабочем растворе 3% перекиси водорода с 0,5% поверхностно активного вещества (ПАВ), в том числе при температуре плюс 50°C;
- с последующей обработкой острым паром в автоклаве типа АГП при температуре плюс 132°C, 2 атм., 120 минут (при работе со споровой формой ПБА);
- в камере типа КДФ при температуре плюс 100°C, 120 минут (при работе с вегетативными формами ПБА).

Испытаниям подвергались следующие изделия рабочей и защитной одежды и ее отдельных элементов:

- халат противочумный с завязками (ХЛ.20);
- халат противочумный с магнитами (ХЛ.20);
- халат противочумный с кнопками (ХЛ.20, ХЛ.21);
- халат с вшитым капюшоном и магнитными застежками (ХЛ.20);
- пижама с охлаждающим эффектом с карманом на правой стороне (КЛ.ФТ.07);
- комбинезон (КБ.Ш.7);
- шапочка медицинская (ШП.Р.3);
- капюшон (ШЛ.Р.14., ШЛ.Р.11.).

В результате испытаний были получены следующие результаты.

Применение различных способов обеззараживания (погружение в дезинфицирующий раствор, обеззараживание острым паром при 100°C или 132°C и повышенном давлении) к изменениям размеров (длины и ширины) изделий, а также к каким-либо другим изменениям в структуре ткани или нарушении целостности всего изделия или его элементов не привело ни при одном из способов обеззараживания.

Халат противочумный с завязками типа ХЛ.20 прошел 104 цикла обеззараживания и стирок при гарантийных 50. Изменений цвета ткани не было, завязки хорошо фиксировали горловину, рукава, пояс не развязывался. Специалисты ГНЦ ПМБ, работавшие с данной моделью одежды, считают, что завязки являются самым удобным и безопасным вариантом фиксации горловины и рукавов халата. Изделие удобно

в эксплуатации и рекомендовано к использованию в лаборатории.

Халат противочумный с кнопками типа ХЛ.20, ХЛ.21. Изделия прошли 52 цикла обеззараживания и стирок. Для работ с ПБА I–IV групп данный вариант использовать нецелесообразно, так как есть постоянный риск расстегивания и открывания халатов на спине, так как кнопки застегиваются плохо, работать и снимать изделие неудобно, изделие к эксплуатации не рекомендовано.

Халат с вшитым капюшоном и магнитными застежками типа ХЛ.20. Изделие прошло 48 циклов обеззараживания и стирок. Использовать в качестве защитной одежды для работ с ПБА I–IV групп нецелесообразно, так как магниты не держат и работать в них, а также снимать их после работы – неудобно. Есть постоянный риск расстегивания и открывания спины (магниты не держат полы халата). Изделие рекомендовано только для изготовления по индивидуальным заказам.

Пижама с охлаждающим эффектом с карманом на правой стороне прошла 50 циклов обеззараживания и стирок. Изделие удобно в носке, эффект охлаждения присутствует. После стирки некоторое время изделие электризуется при надевании. После трех последующих носок электризация исчезает. Учитывая то, что есть «левши» и «правши», рекомендовано сделать модель с расположением карманов справа и слева. Изделие удобно в эксплуатации и рекомендовано к применению в лаборатории.

Капюшон/шлем типа ШЛ.Р.14., ШЛ.Р.11. Прошел 48 циклов обеззараживания и стирок. Изменений цвета ткани нет, усадки нет, молнии застегиваются хорошо. Шлем удобен для эксплуатации. Так как для работы с ПБА III–IV групп капюшон не применяется, он может быть использован, как элемент защитной одежды при проведении работ с ПБА I–II групп.

Шапочка медицинская типа ШП.Р.3. Изделие прошло 52 цикла обеззараживания и стирок. Изменений цвета ткани нет, усадки нет, завязки (тесемки) не развязываются. Изделие удобно в эксплуатации. Рекомендовано для эксплуатации при проведении работ с микроорганизмами I–II групп патогенности в качестве элемента рабочей одежды и элемента рабочей и защитной одежды для работ с ПБА III–IV групп. Цветовую гамму для изделия можно варьировать от светлых к темным тонам.

Испытание рабочей и защитной одежды с отделкой АКВО и отдельных элементов позволило выявить как положительные, так и отрицательные стороны. Так, по сравнению с хлопчатобумажным противочумным костюмом 1–4 типа в комплекте защитной одежды с отделкой АКВО работать сотруднику лаборатории в летнее время года более удобно и комфортно, нежели в классическом противочумном костюме. Обеззараживание рабочей и защитной одежды с отделкой АКВО не влияет на ее структуру и внешний вид, ткань прочная и может быть использована более длительное время, по сравнению с указанным в руководстве по применению изделий. Однако некоторые элементы костюма с отделкой АКВО (например, магнитные держатели) не могут быть применены для использования в костюмах и халатах, и следовательно, сами изделия не могут быть рекомендованы для применения в лаборатории для работ с ПБА I–IV групп,

так как их возможности ограничены и уровень безопасности низок.

Изделия из ткани с отделкой АКВО выдерживают многократное обеззараживание острым паром (автоклавирование) с предварительным замачиванием в растворах дезинфектантов или без проведения данной процедуры. Они сохраняют исходный вид и свои барьерные свойства, и могут использоваться в качестве комплектов защитной одежды для работы в бактериологических лабораториях различных уровней защиты для работ с ПБА I–IV групп.

Финансирование

Работа выполнена в рамках некоммерческого соглашения №005 от 30.04.2013 г.

Литература

1. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. М.: Роспотребнадзор; 2013, 195 с.
2. Санитарно-эпидемиологические правила. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08. М.: Роспотребнадзор; 2008, 76 с.
3. Буянов ВВ, Супрун ИП. Средства индивидуальной защиты для работ в микробиологических и вирусологических лабораториях. Черноголовка, 2001, 324 с.
4. Аброськина ЕА, Тараканов АА, Плеханова НГ, Ротов КА, Снатенков ЕА, Ляпин МН, и др. Защитная одежда нового поколения для работы в микробиологической лаборатории. Биозащита и биобезопасность. 2013;5,3(16):10-7.
5. Тюрин ЕА, Чекан ЛВ, Шишкина ОБ, Тараканов АА. Тестирование современных образцов рабочей и защитной одежды в реальных условиях при проведении работ с ПБА I–IV групп (BSL 3), изготовленной в ООО «Лаборатория Технологической Одежды». Материалы XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года». Саратов, 2016, с. 248-250.

References

1. Sanitary and epidemiological rules Safety of work with microorganisms of I-II groups of pathogenicity (danger). SP 1.3.3118-13. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2013, 195 p. (In Russian).
2. Sanitary and epidemiological rules. Safety of work with microorganisms of III-IV groups of pathogenicity (danger) and causative agents of parasitic diseases. SP 1.3.2322-08. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2008, 76 p. (In Russian).
3. Buyanov VV, Suprun IP. Sredstva individual'noi zashchity dlya rabot v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh. Chernogolovka, 2001, 324 p. (In Russian).
4. Abroskina YeA, Tarakanov AA, Plekhanova NG, Rotov KA, Snatenkov YeA, Lyapin MN, et al. The new generation defensive clothes for work in microbiologic laboratory. Biozashchita i biobezopasnost'. 2013;5,3(16):10-7. (In Russian).
5. Tyurin EA, Chekan LV, Shishkina OB, Tarakanov AA. Testing of modern samples of working and protective clothing in real conditions when working with PBA I-IV group (BSL 3), manufactured in LLC "Laboratory of Technological Clothing". Proceedings of the XIII Scientific and Practical Conference "Achievements in the field of sanitary and epidemiological welfare in the CIS member States in the framework of the who strategy for the implementation of the IHR (2005) 2016". Saratov, 2016, pp. 248-250. (In Russian).

Информация об авторе:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0016
E-mail: turin@obolensk.org

Information about author:

Eugene A. Tyurin, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of biological safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0016
E-mail: turin@obolensk.org

Химический синтез и новые антибиотики

Исследователи из Университета Колорадо в Боулдере разработали новый способ синтеза и оптимизации природного антибиотика, который может быть использован для борьбы со смертельными лекарственно-устойчивыми инфекциями, такими как золотистый стафилококк, широко известный как MRSA.

По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), устойчивые к антибиотикам инфекции ежегодно поражают более 2 миллионов человек и приводят к более чем 23 000 смертей в США. Устойчивые к лекарствам супербактерии были причиной 33 000 смертей в Европе в 2015 году.

Исследователи разработали модифицированную технологию получения природных антибиотиков тиопептидов, и создали два новых антибиотика: микрококцина P1 и тиоциллина I. Соединения являются эффективными, масштабируемыми и не производят вредных побочных продуктов.

Исследование было профинансировано Национальным научным фондом.

Новая методология химического синтеза – это только отправная точка. Планируется использовать эти результаты в качестве платформы для выбора и оценки частей молекул тиопептидов с целью оптимизации их свойств и широкого применения против широкого спектра бактерий.

Elizabethkingia meningoseptica как значимый клинический патоген

М.Е.Канашенко, Н.Н.Карцев, И.П.Мицевич, М.В.Храмов, Э.А.Светоч

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

Elizabethkingia meningoseptica является редкой, но общепризнанной причиной неонатального менингита. К сожалению, в нашей стране клинической роли данного микроорганизма уделяется мало внимания и не ведется учет выявления данного возбудителя. В связи со сложившейся ситуацией подробное освещение проблемы данного возбудителя является актуальным и необходимым для практикующих врачей-бактериологов и исследователей. Хотя роль *E. meningoseptica* в общей доле заболеваемости на данный момент остается незначительной, точная диагностика и идентификация микроорганизма имеют первостепенное значение для клинических бактериологов. Это связано с тем, что течение заболеваний, вызываемых данным видом, ассоциировано с тяжелым и часто летальным исходом, а также ввиду общей множественной лекарственной устойчивости микроорганизма, включая такие препараты, как ампициллин, цефотаксим и гентамицин, широко используемые в эмпирическом лечении менингитов.

Статья содержит анализ литературных данных, посвященных клиническому значению *Elizabethkingia meningoseptica*.
Ключевые слова: *Elizabethkingia meningoseptica*, менингит новорожденных, нозокомиальные инфекции

Для цитирования: Канашенко М.Е., Карцев Н.Н., Мицевич И.П., Храмов М.В., Светоч Э.А. *Elizabethkingia meningoseptica* как значимый клинический патоген. Бактериология. 2019; 4(1): 58–63. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-58-63

Elizabethkingia meningoseptica as a significant clinical pathogene

М.Е.Kanashenko, N.N.Kartsev, I.P.Mitsevich, M.V.Khramov, E.A.Svetoch

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

Elizabethkingia meningoseptica is a rare but generally recognized cause of neonatal meningitis. Unfortunately, in our country little attention is paid to the clinical role of this microorganism and there is no record of detection of the pathogen. For this reason, detailed coverage of the problem of this pathogen is considered to be relevant and necessary for practicing bacteriologists and researchers. Although at the moment the role of *E. meningoseptica* in the overall proportion of morbidity remains insignificant, accurate diagnostics and identification of the microorganism is of paramount importance for clinical bacteriologists. This is due to the fact that the course of diseases caused by this species is associated with severe and often fatal outcome, as well as due to the general multidrug resistance of the microorganism, including such drugs as ampicillin, cefotaxime and gentamicin, widely used in the empirical treatment of meningitis.

The article contains a review of literature on the clinical value of *Elizabethkingia meningoseptica*.

Keywords: *Elizabethkingia meningoseptica*, neonatal meningitis, nosocomial infections

For citation: Kanashenko M.E., Kartsev N.N., Mitsevich I.P., Khramov M.V., Svetoch E.A. *Elizabethkingia meningoseptica* as a significant clinical pathogene. Bacteriology. 2019; 4(1): 58–63. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-58-63

Elizabethkingia названа в честь Элизабет О. Кинг, которая впервые описала бактерии, ставшие причиной менингита у новорожденных, и назвала их [*Flavobacterium meningosepticum*] в 1959 г. В 1994 г. была произведена реклассификация, и возбудитель отнесли к семейству *Flavobacteriaceae*, роду *Chryseobacterium* и переименовали в *Chryseobacterium meningosepticum*. В 2005 г. на основании анализа 16S rRNA было принято решение выделить новый

род *Elizabethkingia*, к которому на данный момент принадлежат четыре вида возбудителя: *E. meningoseptica*, *E. miricola*, *E. anopheles* и *E. endophytica*.

Общая микробиологическая характеристика

Морфологически *E. meningoseptica* представляет собой тонкие, слегка изогнутые одиночные палочки с закругленными концами, грамотрицательные и неподвижные. Они не

Для корреспонденции:

Канашенко Мария Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов, отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: Kanashenko@obolensk.org

Статья поступила 20.02.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Maria E. Kanashenko, junior researcher of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: Kanashenko@obolensk.org

The article was received 20.02.2019, accepted for publication 25.03.2019

образуют эндоспоры и являются облигатными аэробами [1]. О наличии капсулы сообщалось у некоторых штаммов *E. meningoseptica* после постановки биопробы на мышах [2].

Экология и эпидемиология

E. meningoseptica встречается повсеместно в почве и воде. Внутрибольничные вспышки могут возникать в результате воздействия загрязненного источника воды или медицинских устройств. Так, в ходе различных обследований возбудитель был изолирован от источников водоснабжения, раковин, кранов, солевого раствора, используемого для процедур промывки, дезинфицирующих средств и медицинских устройств, включая трубки для кормления, артериальные катетеры и респираторы.

Экологические исследования показали, что организм может выживать в обработанных хлором муниципальных системах водоснабжения, часто колонизируя раковины и краны, трубки для интубации, увлажнители, инкубаторы для новорожденных, и становится потенциальным резервуаром для инфекций в больничной среде. Помимо этого, заражение данным видом микроорганизма может происходить от работников медицинского учреждения, являющихся бессимптомными носителями возбудителя [3–6].

Культуральные свойства

E. meningoseptica хорошо растет на обычных питательных средах и не требует дополнительных факторов роста. Колонии обычно гладкие, блестящие, беловатые или бледно-желтые, выпуклые, округлой формы с ровными краями, диаметром до 2 мм. Подобно колониям многих штаммов *Chryseobacterium*, их маслянистая консистенция переходит в слизистую после нескольких дней инкубации [7].

По некоторым данным, на кровяном агаре гемолиз отсутствует, но у некоторых штаммов среда может иметь зеленое или сероватое обесцвечивание вокруг колоний из-за протеаз и желатиназы. Однако более поздние исследования сообщают о наличии альфа-гемолиза, подтверждаемого обнаружением генов, кодирующих гемолизины [8].

Отличительной чертой является медленный и слабый рост или его отсутствие на агаре МакКонки. Аэробные условия культивирования при температуре 22–37°C являются наиболее оптимальными, однако, по некоторым данным, штаммы *E. meningoseptica*, включающие изоляты неонатального менингита и бактериемии, могут расти при 40°C [9].

Виды *Elizabethkingia* являются галотолерантными – особенность, наблюдаемая у представителей большинства видов семейства *Chryseobacterium*. Штаммы *E. meningoseptica* способны расти на морском агаре 2216E (Difco) [10].

Способность расти в присутствии 3% NaCl в бульонной культуре варьирует среди штаммов [11].

Биохимическая активность

Данный возбудитель относится к группе неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), однако его биохимические свойства весьма переменчивы, что делает идентификацию микроорганизма на основании биохимических реакций ненадежной. В связи с этим результаты, полученные на автоматических системах идентификации бактерий, следует оценивать с осторожностью. Так, по некоторым ли-

тературным данным, подтвержденным нашим практическим опытом, при постановке теста на автоматическом микробиологическом анализаторе Vitek 2 – Compact (BioMérieux, Франция) *E. meningoseptica* ошибочно принималась за *Sphingobacterium spp.* (микроорганизм, так же принадлежащий к семейству *Flavobacteriaceae*) [12]. Типичные штаммы рода *Elizabethkingia* являются хемоорганотрофами со строго аэробным типом метаболизма [13, 14].

Большинство штаммов проявляют каталазную, оксидазную и фосфатазную активность, а также синтезируют b-галактозидазу. Представители вида *Elizabethkingia meningoseptica* демонстрируют выраженную протеолитическую активность, гидролизуют казеин и желатин и продуцируют индол из триптофана [11, 10, 14]. Все 149 штаммов *E. meningoseptica*, изученных CDC [15], и все 52 штамма, изученных Bruun и Ursing (1987), продуцировали индол. В последнем исследовании штаммы не продуцировали уреазу, в отличие от исследования 49 штаммов *E. meningoseptica*, проведенного Holmes и соавт. [2], и исследования CDC [15], где этот признак варьировал среди штаммов. Авторы объясняют несоответствия результатов методологическими различиями в постановке теста.

Некоторые углеводы, включая d-глюкозу, d-фруктозу, d-маннит, маннозу, лактозу и мальтозу, окисляются штаммами *E. meningoseptica* без образования газа, однако целлюлоза, рамноза, рафиноза, галактоза, сахароза, мелезито-за, салицин, адонит, дульцит, сорбит и инозитол окислению не подвергаются [2, 10–12]. Гидролизу подвергаются эскулин и желатин, в то время как тесты на гидролиз агара и крахмала отрицательны.

В целом они отрицательны по тесту на нитратредуктазу, хотя некоторые штаммы являются положительными [16].

Диагностика

Межвидовая дифференциация представителей рода *Elizabethkingia* с использованием рутинных морфологических и биохимических тестов в клинических лабораториях затруднена [17]. Сравнение идентичности 16S рПНК не дает достаточного разрешения для идентификации и разделения этих тесно связанных видов [18, 19]. На настоящее время единственным достоверным методом идентификации является масс-спектрометрия MALDI-TOF [18]. Ограничением данного метода является то, что оборудование для проведения вышеупомянутого анализа недоступно во многих клинических микробиологических лабораториях. Также существует коммерческий набор MIKROLATEST NEFERMtest24 (Erba Lachema, Чехия), где заявлена возможность проведения идентификации *E. meningoseptica*. В будущем необходима разработка инструментов молекулярной диагностики, которые могли бы быть потенциально доступными для всех лабораторий.

Патология

Elizabethkingia являются типичными условно-патогенными микроорганизмами, которые вызывают инфекционный процесс только на фоне иммуносупрессии. Факторами риска служат тяжелые травмы, обширные ожоги, злокачественные новообразования, большие хирургические вмешательства, лучевая, гормональная и цитостатическая тера-

пия, патология новорожденных, синдром приобретенного иммунодефицита, пожилой возраст. Искусственная вентиляция легких, диализ, наличие имплантированных медицинских устройств (катетеры, дренажные трубки и т.д.) в значительной степени усиливают риск присоединения инфекции [19–22]. Так, согласно исследованию 118 случаев бактериемии *E. meningoseptica* в одном из медицинских центров Тайваня, заболеваемость (на 100 000 госпитализаций) бактериемией *E. meningoseptica* увеличилась с 7,5 в 1996 г. до 35,6 в 2006 г., а наиболее распространенными предрасполагающими факторами среди взрослых пациентов были злокачественные новообразования (36%) и сахарный диабет (25%) [19].

Согласно тому же исследованию, у 78% пациентов первичная бактериемия сопровождалась пневмонией (9%), инфекцией мягких тканей и катетер-ассоциированной бактериемией (6%). Сорок пять пациентов (38%) страдали полимикробной бактериемией. В целом 14-дневная смертность составила 23,4%.

Кроме того, у взрослых *E. meningoseptica* может вызывать эндокардит, целлюлит, абдоминальную инфекцию, раневую инфекцию, синусит, эпидидимит, диализный перитонит, септический артрит и глазные инфекции [23, 24]. Также отмечается возможность колонизации раневых поверхностей, мочеполового тракта и слизистых оболочек без признаков инфекции [25].

У новорожденных менингит является наиболее распространенной клинической формой заболевания, вызываемого этим микроорганизмом. Бактериемия и пневмония – другие частые проявления у новорожденных. Инфекции обычно возникают у недоношенных детей и часто проходят в виде вспышек болезни [25, 26].

В медицинской литературе особенно отмечается, что неонатальный менингит, ассоциированный с *E. meningoseptica*, связан с плохим исходом и тяжелым осложненным течением заболевания. По данным одного из обзоров, уровень смертности среди новорожденных составил 33%, в то время как по другим данным эта цифра достигла 57%, а гидроцефалия развилась у 69% выживших [27, 28]. Глухота и задержка развития также отмечались в 8 и 6% случаев соответственно [26].

Так, например, во время вспышки заболеваемости в одном из перинатальных центров на Маврикии с августа 2002 г. по декабрь 2003 г. было зарегистрировано восемь случаев менингита, вызванного *E. meningoseptica*, среди детей, поступивших в отделение для недоношенных новорожденных. Во всех случаях микроорганизм был изолирован из спинномозговой жидкости. Всего было зарегистрировано два летальных исхода: первый – вскоре после поступления и второй – от развившейся гидроцефалии в ходе патогенетического лечения комбинацией пиперациллина и рифампицина. Также в двух случаях развились осложнения: гидроцефалия и тяжелые неврологические нарушения. В четырех случаях из восьми наблюдалось полное выздоровление [27].

В Российской Федерации в ходе эпидемиологического исследования в одном из перинатальных центров в 2016 г. в течение одного месяца были зарегистрированы 3 случая сепсиса, ассоциированного с *E. meningoseptica* у недоно-

шенных новорожденных, имевшие летальный исход (неопубликованные данные, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

В настоящее время доступна лишь скудная информация о механизмах вирулентности *E. meningoseptica*. В исследовании 2006 г. дикie штаммы и клинические изоляты от заболевших людей были отобраны и испытаны на инвазивность, цитотоксичность на клеточных культурах, чувствительность к антибактериальному действию человеческой сыворотки и на модели легочной инфекции у мышей с интратрахеальным путем заражения. Все штаммы были устойчивы к бактерицидной активности нормальной сыворотки человека, не проявляли инвазивность на культуре клеток и были лишены цитотоксической активности. По результатам электронно-микроскопических исследований образцов зараженного легкого было показано, что, в отличие от дикого штамма, изолят микроорганизма от заболевшего человека смог проникнуть в эпителиальные клетки дыхательных путей. Однако спустя 7 дней от момента заражения наблюдалась полная эрадикация возбудителя из легочной ткани. Ни один штамм не был обнаружен ни в печени, ни в селезенке и не привел к гибели животного [29].

В 2017 г., при анализе генома штамма, выделенного из образца мокроты у пациента, были обнаружены гены, кодирующие тиол-активированный холестеринзависимый белок (связанный с метаболизмом цитолизина и потенциально отвечающий за лизис иммунных клеток хозяина), гемолизин, гемм и белок, участвующий в образовании биопленок, а также адгезии бактерий к клеточным поверхностям-мишеням. Анализ биопленки *in vitro* показал, что по сравнению с изолятами *E. anophelis* и *E. miricola* клинические изоляты *E. meningoseptica* обладали лучшей способностью образовывать биопленку [30, 31]. Кроме того, обнаружены гены, кодирующие перфринголизин, цитотоксический токсин и токсин лейкостаза, который позволяет избежать фагоцитарной активности иммунной системы хозяина [32, 33].

Антибиотикорезистентность

Штаммы *Elizabethkingia meningoseptica* являются природно устойчивыми к полимиксидам, аминогликозидам (например, гентамицину, стрептомицину), хлорамфениколу и большинству β-лактамов антибиотиков, включая пенициллин и ампициллин [34].

Штаммы *Elizabethkingia meningoseptica* продуцируют по меньшей мере три типа β-лактамаз, две карбапенемгидролизующие металло-β-лактамазы класса В (MBL) [35], ассоциированные с резистентностью к азтреонаму и карбапенемам (в том числе имипенему), причем последние являются основными лекарственными средствами для лечения грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [36], а также неиндуцируемую β-лактамазу с расширенным спектром класса А (ESBL), исключаящие и цефалоспорины с расширенным спектром действия (цефотаксим, цефтазидим, цефепим) [37–39].

Было проведено множество исследований спектра генов резистентности к антимикробным препаратам. Парадоксально, *E. meningoseptica* часто восприимчив к антибактериальным препаратам, традиционно используемым для лечения инфекций, вызванных грамположительными бактериями.

Штаммы *E. meningoseptica* в основном устойчивы к тетрациклам, эритромицину и линезолиду, а также устойчивы или промежуточно чувствительны к клиндамицину и ванкомицину. Чувствительность к триметоприму/сульфаметоксазолу варьирует от 33 до 80% штаммов. Антибиотиками, которые наиболее активны в отношении *Elizabethkingia meningoseptica*, являются миноциклин, рифампицин и хинолоны новых поколений (левофлоксацин, гатифлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин), в то время как восприимчивость к ципрофлоксацину варьирует [40].

Кроме того, *E. meningoseptica* является единственным в своем роде микроорганизмом, имеющим два хромосомно кодируемых гена *MBL*. ПЦР в реальном времени и биохимический анализ демонстрируют, что три гена *bla* активно экспрессируются *in vivo* в виде функциональных β-лактамаз. Согласно исследованиям, наиболее часто выявлялись различные аллели *bla*V и *bla*GOB, отвечающие за синтез металло-β-лактамаз класса B [39].

Помимо этого, были идентифицированы так называемые *bla*CME (*C. meningosepticum* ESBL), кодирующие CME серин-β-лактамазы (SBL) класса D, связанные с устойчивостью к цефалоспорином [40, 41].

В другом исследовании выявили детерминанты устойчивости к триметоприму/сульфаметоксазолу с помощью ПЦР; шесть изолятов обладали геном *sull* и четыре геном *sulll*, тогда как ген *dfrA12* был обнаружен только в одном из них [42].

Анализ генов устойчивости к аминогликозидам показал, что изучаемый штамм содержал несколько генов-кандидатов на устойчивость к аминогликозидам, включая одну 16S рРНК метилазу, две аминогликозидфосфотрансферазы и одну аминогликозидную нуклеотидилтрансферазу [43].

В связи с подобной картиной множественной антибактериальной устойчивости трудно определить наиболее подходящий спектр эффективных антимикробных препаратов для лечения менингита, вызванного *E. meningoseptica*. Обзор медицинской литературы подтверждает частое неправильное применение антибиотиков при инфекциях *Elizabethkingia meningoseptica* и его последующее влияние на риск смертности [44–46].

Ранее исследователи рекомендовали ванкомицин, особенно в случаях инфантильного менингита, но впоследствии его эффективность была поставлена под сомнение многими исследователями ввиду противоречивых результатов с высокими значениями МИК [46–48]. В связи с этим нередко сообщения о сочетанном применении ванкомицина и рифампицина для усиления синергизма и достижения положительных клинических результатов [27].

Также важно отметить, что, согласно некоторым исследованиям, были отмечены несоответствия в паттернах чувствительности при постановке тестов диско-диффузионным методом и методом серийных разведений в бульоне. Таким образом, определение чувствительности диско-диффузионным методом, как правило, не рекомендуется [49, 50].

Заключение

Elizabethkingia meningoseptica является относительно новой и малоизученной инфекцией и представляет собой внутрибольничную угрозу с высоким риском осложнений и смер-

ности у недоношенных новорожденных и иммунокомпрометированных больных. Клиническим микробиологам следует рассматривать этот микроорганизм как потенциальный патоген и в обязательном порядке проводить тесты на чувствительность к антибиотикам ввиду уникального характера его восприимчивости к АМП и не допускать эмпирического назначения препаратов против грамотрицательных бактерий, которое, как показывает опыт, может привести к неблагоприятному результату. Также стоит принимать во внимание, что в условиях стационарного лечения нельзя исключить возникновение сочетанных инфекций с участием возбудителей, полнорезистентных к антибактериальной терапии.

В перспективе необходимо установить активные меры инфекционного контроля за данным возбудителем, такие как регулярная проверка водных резервуаров в больницах, а также поверхностей и оборудования для парентеральных манипуляций. Наравне с этим хотелось бы, чтобы велась и публиковалась статистика выявления данного возбудителя на базе клинических лабораторий стационаров, в особенности перинатальных центров, с указанием спектра применяемых антимикробных препаратов и клинических исходов. И наконец, повышение точности идентификации бактерий и стандартизация тестов на чувствительность к антибиотикам имеют ключевое значение для ранней диагностики и этиологического лечения инфекций, ассоциированных с *Elizabethkingia meningoseptica* с целью снижения смертности и неврологических осложнений.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература/References

1. Krieg NR, Ludwig W, Whitman W, Hedlund BP, Paster BJ, Staley JT, Ward N, Brown D, Parte A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, Second edition, 202-210. 2010, 1984–1989 Bergey's Manual Trust.
2. Holmes B, Owen RJ, McMeekin TA. Genus *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon 1923, 97AL. Edited by N.R.Krieg, J.G.Holt. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1983a; 1: 353–361.
3. Ceyhan M, Yildirim I, Tekeli A, Yurdakok M, Us E, Altun B, et al. A *Chryseobacterium meningosepticum* outbreak observed in 3 clusters involving both neonatal and non-neonatal pediatric patients. Am J Infect Control. 2008 Aug;36(6):453-7. DOI: 10.1016/j.ajic.2007.09.008
4. Bloch KC, Nadarajah R, Jacobs R. *Chryseobacterium meningosepticum*: An emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. Medicine (Baltimore). 1997 Jan;76(1):30-41. DOI: 10.1097/00005792-199701000-00003
5. Hoque SN, Graham J, Kaufmann ME, Tabaqchali S. *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect. 2001 Mar;47(3):188-92. DOI: 10.1053/jhin.2000.0908

6. Martin K, Crisp C, Jurgensen JH. San Diego, Calif, USA: Abstract M52 in Proceedings of the Program and Abstracts of the 5th Annual meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA); 1995. Outbreak of *Flavobacterium meningosepticum* in a surgical intensive care unit (SICU) [Google Scholar].
7. Kim KK, Bae HS, Schumann P, Lee ST. *Chryseobacterium daecheongense* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005 Jan;55(Pt 1):133-8. DOI: 10.1099/ijs.0.02931-0
8. Chen S, Soehnlén M, Downes FP, Walker ED. Insights from the draft genome into the pathogenicity of a clinical isolate of *Elizabethkingia meningoseptica* Em3. *Stand Genomic Sci*. 2017 Sep 16;12:56. DOI: 10.1186/s40793-017-0269-8
9. Phenotypic characterisation of *Flavobacterium meningosepticum* strains identified by DNA-DNA hybridisation, Brita Bruun, Jan Ursing, September 1987.
10. Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, Bizet C, et al. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst Appl Microbiol*. 2005 Sep;28(7):640-60. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.03.016
11. Li Y, Kawamura Y, Fujiwara N, Naka T, Liu H, Huang X, Kobayashi K, Ezaki T. *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. *Syst Appl Microbiol*. 2003 Nov;26(4):523-8. DOI: 10.1078/072320203770865828
12. Tuon FF, Campos L, Duboc de Almeida G, Grysczek RC. *Chryseobacterium meningosepticum* as a cause of cellulitis and sepsis in an immunocompetent patient. *J Med Microbiol*. 2007 Aug;56(Pt 8):1116-7.
13. Bernardet J-F, Hugo CJ, Bruun B. The genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. In *The Prokaryotes*, 7th edn, Ch. 6.12, pp. 638–676. Edited by M.Dworkin, S.Falkow, E.Rosenberg, K.-H.Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer; 2006.
14. Vandamme P, Bernardet J-F, Segers P, Kersters K, Holmes B. New perspectives in the classification of the flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1994;44(4):827-31.
15. Weyant et al., Williams & Wilkins, 1996 Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and facultatively anaerobic bacteria, 2nd ed., CDC, Atlanta, GA.
16. Chiu CH, Waddington M, Greenberg D, Schreckenberger PC, Carnahan AM. Atypical *Chryseobacterium meningosepticum* and meningitis and sepsis in newborns and the immunocompromised, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2000 Sep-Oct;6(5):481-6. DOI: 10.3201/eid0605.000506
17. Lau SK, Chow WN, Foo CH, Curreem SO, Lo GC, Teng JL, et al. *Elizabethkingia anopheles* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. *Sci Rep*. 2016 May 17;6:26045. DOI: 10.1038/srep26045.
18. Kim KK, Kim MK, Lim JH, Park HY, Lee ST. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005 May;55(Pt 3):1287-93. DOI: 10.1099/ijs.0.63541-0
19. Hsu MS, Liao CH, Huang YT, Liu CY, Yang CJ, Kao KL, Hsueh PR.. Clinical features, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of *Elizabethkingia meningoseptica* (*Chryseobacterium meningosepticum*) bacteremia at a medical center in Taiwan, 1999–2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;30(10):1271-8. DOI: 10.1007/s10096-011-1223-0
20. Adachi A, Mori T, Simizu T, Yokoyama A, Takayama N, Ikeda Y, et al *Chryseobacterium meningosepticum* septicemia in a recipient of allogeneic cord blood transplantation. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(6-7):539-40.
21. Kirby JT, Sader HS, Walsh TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):445-8. DOI: 10.1128/jcm.42.1.445-448.2004
22. Güngör S, Ozen M, Akinci A, Durmaz R. A *Chryseobacterium meningosepticum* outbreak in a neonatal ward. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 Aug;24(8):613-7. DOI: 10.1086/502261
23. du Moulin GC. Airway colonization by *Flavobacterium* in an intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 1979 Aug;10(2):155-60.
24. Nulens E, Bussels B, Bols A, Gordts B, van Landuyt HW. Recurrent bacteremia by *Elizabethkingia eindologenes* in an oncology patient with a totally implanted intravenous device. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Jul;7(7):391-3.
25. Bloch KC, Nadarajah R, Jacobs R. *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 1997 Jan;76(1):30-41. DOI: 10.1097/00005792-199701000-00003
26. Hawley HB, Gump DW. Vancomycin therapy of bacterial meningitis. *Am J Dis Child*. 1973 Aug;126(2):261-4.
27. Mohammad II, Yaseen N. An outbreak of *Elizabethkingia meningoseptica* neonatal meningitis in Mauritius Central Health Laboratory, Victoria Hospital, Candos, Mauritius. Paediatric Unit, Jawarharlal Nehru Hospital, Rose-Belle, Mauritius.
28. Lin PY, Chiu CH, Chu C, Tang P, Su LH. Invasion of murine respiratory tract epithelial cells by *Chryseobacterium meningosepticum* and identification of genes present specifically in an invasive strain. *New Microbiol*. 2006 Jan; 29(1):55-62.
29. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 2009 Jun 18;5(6):580-92. DOI: 10.1016/j.chom.2009.05.011.
30. Yaron S, Römling U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb Biotechnol*. 2014 Nov;7(6):496-516. DOI: 10.1111/1751-7915.12186.
31. Chen S, Soehnlén M, Walker ED. Genome Sequence of *Elizabethkingia meningoseptica* EM1, Isolated from a Patient with a Bloodstream Infection. *Genome Announc*. 2016 Oct 27;4(5). pii: e01137-16. DOI: 10.1128/genomeA.01137-16.
32. Chen S, Soehnlén M, Downes FP, Walker ED. Insights from the draft genome into the pathogenicity of a clinical isolate of *Elizabethkingia meningoseptica* Em3. *Stand Genomic Sci*. 2017 Sep 16;12:56. DOI: 10.1186/s40793-017-0269-8.
33. Kirby JT, Sader HS, Walsh TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):445-8. DOI: 10.1128/jcm.42.1.445-448.2004
34. Rossolini GM, Franceschini N, Riccio ML, Mercuri PS, Perilli M, Galleni M, Frere JM, Amicosante G. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile. *Biochem J*. 1998 May 15;332 (Pt 1):145-52. DOI: 10.1042/bj3320145
35. Ceyhan M, Celik M. *Elizabethkingia meningosepticum* (*Chryseobacterium meningosepticum*) infections in Children. *Int J Pediatr*. 2011;2011:215237. DOI: 10.1155/2011/215237
36. Bellais S, Poire L, Naas T, Girlich D, Nordmann P. Genetic biochemical analysis and distribution of the Ambler class A-lactamase CME-2, responsible for extended spectrum cephalosporin resistance in *Elizabethkingiae* (*Flavobacterium*) *meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):1-9.
37. Chen GX, Zhang RH, Zhou W. Heterogeneity of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Elizabethkingiae meningosepticum* from Hangzhou China. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr;57(4):750-2. DOI: 10.1093/jac/dkl019
38. González LJ, Vila AJ. Carbapenem Resistance in *Elizabethkingia meningoseptica* Is Mediated by Metallo-β-Lactamase BlaB. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):1686-92. DOI: 10.1128/AAC.05835-11
39. Chen GX, Zhang R, Zhou HW. Heterogeneity of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Chryseobacterium meningosepticum* from Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr;57(4):750-2. DOI: 10.1093/jac/dkl019

40. Bellais S, Poirel L, Naas T, Girlich D, Nordmann P. Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A β -lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):1-9.
41. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M, et al. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*bla*ACME) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Sep;43(9):2193-9.
42. Jiang X, Wang D, Wang Y, Yan H, Shi L, Zhou L. Occurrence of antimicrobial resistance genes *sul* and *dfpA12* in hospital environmental isolates of *Elizabethkingia meningoseptica*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012 Nov;28(11):3097-102. DOI: 10.1007/s11274-012-1119-x
43. Sun G, Wang L, Bao C, Li T, Ma L, Chen L. Complete Genome Sequence of *Elizabethkingia meningoseptica*, Isolated from a T-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Patient. *Genome Announc*. 2015 Jun 25;3(3). pii: e00673-15. DOI: 10.1128/genomeA.00673-15.
44. Fraser SL, Jorgensen JH. Reappraisal of the antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and methods for reliable susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Dec;41(12):2738-41.
45. Hsu MS, Liao CH, Huang YT, Liu CY, Yang CJ, Kao KL, Hsueh PR. Clinical features, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of *Elizabethkingia meningoseptica (Chryseobacterium meningosepticum)* bacteremia at a medical center in Taiwan, 1999–2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;30(10):1271-8. DOI: 10.1007/s10096-011-1223-0
46. Lin PY, Chen HL, Huang CT, Su LH, Chiu CH. Biofilm production, use of intravascular indwelling catheters and inappropriate antimicrobial therapy as predictors of fatality in *Chryseobacterium meningosepticum* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Nov;36(5):436-40. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.033.
47. Fraser SL, Jorgensen JH. Reappraisal of the antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and methods for reliable susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Dec;41(12):2738-41.
48. Chang JC, Hsueh PR, Wu JJ, Ho SW, Hsieh WC, Luh KT. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium* as determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jun;41(6):1301-6.
49. Aber RC, Wennersten C, Moellering RC Jr. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978 Sep;14(3):483-7. DOI: 10.1128/aac.14.3.483
50. Johnny M, Khuffash FA, Elhag KM. Antimicrobial treatment of *Flavobacterium meningosepticum* infection. *Ann Trop Paediatr*. 1983 Sep;3(3):125-8.

Информация об авторах:

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: kartsev@obolensk.org

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: mitzevich_i_p@obolensk.org

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-он, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, researcher of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: kartsev@obolensk.org

Irina P. Mitzevich, researcher of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail V. Khranov, MD, PhD, deputy director for quality and development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Edward A. Svetoch, Dr. Sci. (Vet.), professor, chief researcher of the antimicrobial agents laboratory, department of molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

НОВОСТИ НАУКИ

Точная геномная инженерия

Редактирование генома через системы CRISPR-Cas – перспективный подход для исправления генетических мутаций, которые происходят в больных клетках, таких как раковые клетки. Однако способность избирательно активировать системы CRISPR-Cas в пораженных клетках важна для обеспечения того, чтобы редактирование генов происходило только там, где это необходимо. Разработана система, с помощью которой редактирование генов может активироваться магнитным полем, что позволяет осуществлять пространственный контроль. Использование наноманитов в системе также улучшило трансдукцию в клетки-мишени в моделях мышей с опухолями. Этот подход может потенциально позволить использовать систему CRISPR-Cas в терапевтических целях.

Spatial control of in vivo CRISPR–Cas9 genome editing via nanomagnets
Haibao Zhu, Linlin Zhang, Sheng Tong, Ciaran M. Lee, Harshavardhan Deshmukh & Gang Bao
Nature Biomedical Engineering. 2018. DOI: 10.1038/s41551-018-0318-7

В нынешнем году исполняется 45 лет со дня основания Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, организации-учредителя журнала «Бактериология».

Начиная с этого номера мы будем публиковать статьи о развитии отдельных научных направлений во ФБУН ГНЦ ПМБ и актуальных проблемах науки и производства, которыми центр занимается в настоящее время.

Редколлегия журнала «Бактериология»

Как все начиналось. Воспоминания ветерана

Н.В.Поправко

ООО «Веда», г. Протвино, Московская обл., Российская Федерация

В статье представлены воспоминания одного из бывших руководителей ВНИИ прикладной микробиологии о начале строительства института, проблемах, которые приходилось преодолевать. Названы руководители и сотрудники различных организаций и ведомств, способствовавшие становлению института.

Для цитирования: Поправко Н.В. Как все начиналось. Воспоминания ветерана. Бактериология. 2019; 4(1): 64–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-64-67

How it all began. Veteran memories

N.V.Poppravko

Veda LLC, Protvino, Moscow region, Russian Federation

The article presents the memories of one of the former heads of the All-Russia Research Institute of Applied Microbiology about the beginning of the construction of the institute, the problems that had to be overcome. The leaders and employees of various organizations and departments that contributed to the formation of the institute were named.

For citation: Poppravko N.V. How it all began. Veteran memories. Bacteriology. 2019; 4(1): 64–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-64-67

ЦК КПСС и Совет Министров СССР 19 апреля 1974 г. приняли постановление №304 «О мерах по ускоренному развитию молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве». В нем ставились задачи ускоренного развития молекулярной биологии, молекулярной генетики и прочих областей естествознания, непосредственно связанных с изучением физико-химических основ жизненных явлений, а конечной целью было внедрение новейших достижений этой области естествознания в различные отрасли народного хозяйства. В порядке выполнения этого решения были выделены ассигнования на организацию ряда специализированных научно-исследовательских учреждений, проектных и конструкторских организаций. Под эгидой этого постановления создавался и развивался Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии (ВНИИ ПМ, ныне Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора).

Согласно Уставу ВНИИ ПМ, утвержденному начальником Главного управления микробиологической промышленности при Совете министров СССР 12.04.1976 г., предполагалось, что



Поправко

Николай Васильевич – заместитель директора ВНИИ ПМ (1975–1983 гг.), председатель Совета ветеранов атомной промышленности, энергетики и науки Протвино, член Серпуховской Торгово-промышленной палаты, лауреат премии губернатора Московской области за книгу «Город на Протве». Ныне – начальник отдела по связям с общественностью ООО «Веда».

«...институт является головной организацией по получению новых форм микроорганизмов для нужд народного хозяйства с применением современных молекулярно-биологических методов, а также осуществляет первичную технологическую оценку полученных микроорганизмов с целью определения перспективности их внедрения в промышленность».

Важнейшей задачей института является ускорение научно-технического прогресса в области:

- разработки современных методов получения новых форм микроорганизмов;
- разработки эффективных методов селекции микроорганизмов;
- разработки методов лабораторной и производственной оценки микроорганизмов;
- оптимизации технологических процессов получения биопрепаратов;
- разработки рациональных форм биопрепаратов, выпускаемых промышленностью;
- разработки современных видов приборов для научных исследований и контроля технологических процессов...»

Однако до начала уставной деятельности нужно было еще построить институт, оснастить его современным оборудованием, сформировать научный коллектив, обеспечить сотрудников жильем, наладить их быт и многое другое...

В 1974 г. я был заместителем начальника СМУ-1, которое начинало работы на площадке ВНИИ ПМ в районе д. Мокрое в 20 км от тогда еще поселка Протвино Серпуховского района Московской области. Начальником СМУ-1 был В.Л.Угрюмов, главным инженером – И.П.Дроздов. Меня назначили ответственным за этот госзаказ №055. Главным инженером проекта была Т.Д.Жернова. Строительство предполагалось объемное, тематика для нас была новой.

«Десант» был очень тяжелым, потому что объектов инфраструктуры как таковых тогда там не было. Было сплошное болото. Транспортной схемы тоже не было. Нашей задачей было достроить дорогу от Протвино до д. Калугино, поскольку возить строителей через Серпухов из Протвино на площадку было накладно. Для строителей построили три палатки и временную котельную.

В конце 1974 г. на объект приехала комиссия из НПО «Биопрепарат», в составе которой был первый директор института Д.В.Виноградов-Волжинский, с которым я тогда и познакомился. Потом, когда Волжинский перебрался в Протвино в начале 1975 г., мы контактировали уже гораздо теснее и плодотворнее. Он нам рассказал о тематике института, направлении его будущего развития.



Здание управления ВНИИ ПМ в Протвино с 01.11.1974 г. по 01.01.1979. Фото 1976 г.

Весной 1975 г. в Протвино проходило совещание с участием начальника Главмикробиопрома при СМ СССР В.Д.Беляева, представителей ЦК КПСС, Минфина, Госплана, ВПК. Я участвовал в подготовке и проведении этого совещания, которое при содействии руководства Института физики высоких энергий (ИФВЭ) мы организовали в Доме Ученых п. Протвино.

Главным предметом обсуждения были сроки начала работ института. Срочно надо было строить какие-то временные сооружения, потому что нужны были эксперименты, нужны были помещения, а у нас их не было. В ходе этого обсуждения я обратил на себя внимание тем, что владел местной обстановкой в вопросах строительства, межведомственных отношений и кадров. В целях ускорения запуска работы института было принято решение о строительстве вспомогательного лабораторного городка, где до ввода в эксплуатацию основных корпусов предполагалось развернуть первые научные лаборатории. Осенью 1976 г. ВЛГ уже начал функционировать.

В мае 1975 г. И.М.Кораблев (зам. директора по капитальному строительству ВНИИ ПМ) пригласил меня на празднование Дня Победы. Мероприятие проходило в здании управления в Протвино. Присутствовали около 30 человек. Тогда Д.В.Виноградов-Волжинский предложил мне перейти на работу во ВНИИ ПМ, что и произошло осенью 1975 г.



Вспомогательный лабораторный городок: слева – панорама стройки, справа – разгрузка лабораторного оборудования. В центре В.Я.Волков и В.И.Артюхин (начальник лаборатории и с.н.с. №6). 1977 г.

Не скрою, будучи сотрудником института, мне часто приходилось выезжать в Москву для согласования вопросов организации работы объектов института на высоком уровне. И мне поступило предложение переехать на работу в Москву, однако я отказался. Меня заинтересовала работа на новом объекте. Кроме того, директор института, прибывший из Ленинграда, нуждался в налаживании связей на новом месте и т.д., а я владел обстановкой в полной мере. Руководство с пониманием отнеслось к моим аргументам, и Волжинский тоже оценил этот мой поступок.

Первую задачу мне поставили – получить лимит на прописку прибывающих на работу сотрудников, которых прибывало по несколько сотен в год. Часть из них направляли в аспирантуру и на стажировку в ведущие профильные научно-исследовательские организации Москвы, Пушкино, Саратова, Ленинграда. Оставшиеся нуждались в жилье и прописке. В Московской области тогда существовали ограничения на регистрацию и проживание граждан. Несмотря на плановость экономики, на существование решения об организации нового института, на уже упоминавшееся Постановление

Этапы становления инфраструктуры ВНИИ ПМ

	Годы	Объекты
Научная база	1974–1975	База в Протвино
	1976–1982	Вспомогательный лабораторный городок (ВЛГ)
	1978–1982	Здание 300 в Серпухове
	1977–1985	Комплекс научно-экспериментальной зоны (корпус №1)
	1984–1988	Виварный комплекс
Инженерно-производственный сектор	1976–1977	Энергоснабжение
	1977–1980	Магистральные сети
	1978–1985	Теплоснабжение
	1977–1980	Электроснабжение
	1978–1981	Водоснабжение и водоотведение
	1979–1984	Воздухоохлодоснабжение
	1977–1983	Ремонтно-складская база
	1979–1982	Транспортная база
1998	Связь	



Руководство ИФВЭ (слева направо: В.А.Ярба, Л.Д.Соловьев, Е.В.Алеев, Н.Е.Тюрин) во время встречи с директором ВНИИ ПМ Д.В.Виноградовым-Волжинским в Оболенске (1979 г.).



Объекты инфраструктуры ВНИИ ПМ: столовая «Дубрава», школа и поликлиника в п. Оболенск, жилые дома в п. Большевик.

ЦК КПСС и Совета Министров СССР, вопрос о лимите на прописку решался туго. Вооружившись письмом от имени Академии наук, Главмикробиопрома, от директора ВНИИ ПМ, мне пришлось обойти многие инстанции, но решение было найдено, и лимит на прописку в размере 200 человек ежегодно был выделен. По этому поводу с нами консультировалось даже руководство ИФВЭ, у которого были аналогичные проблемы. В период, когда ВНИИ ПМ еще не располагал собственным жильем, очень помогли руководители предприятий и организаций Серпухова, Протвино и Пущино. Руководители структурных подразделений ВНИИ ПМ получали отдельные квартиры, молодые специалисты размещались в общежитиях и гостиницах. В последующем были построены общежитие №1 в Оболенске (1977 г.) на 100 мест и первые жилые дома в п. Большевик (1980 г.). Позднее были введены в эксплуатацию жилые дома в п. Оболенск.

Не менее сложным вопросом было получение фондов на продовольственные и промышленные товары, организация торговли, общепита и медицинского обслуживания сотрудников института. В связи с успешным решением этих вопросов я бы хотел отметить помощь Минсредпрома в лице зам. министра А.М.Петросянца, начальника УРСа Н.Т.Будаева, начальника 3 Управления Минздрава СССР А.И.Бурназяна, руководителей и сотрудников ОРСа и МСЧ-66 г. Протвино.

Вспоминая прошлое, хочу отметить, что работа во ВНИИ ПМ была сложной, но интересной и самое главное – результативной. По долгу службы мне пришлось встречаться с интересными и выдающимися людьми, без внимания и государственного подхода которых многие вопросы становления ВНИИ ПМ и его инфраструктуры было бы сложно решить. Просто назову их: В.Д.Беляев – начальник Главного управления микробиологической промышленности при Совете Министров СССР, В.А.Быков – партийный деятель и министр СССР, сотрудники НПО «Биопрепарат» В.И.Огарков, А.А.Цыганков, Л.Ф.Лазутина, Б.Я.Смирнов, Л.А.Ключарев, Г.И.Бенецкий, В.Д.Савельев – директор ИФВЭ, А.А.Астахов – зам. министра финансов СССР.

Хочу также выразить благодарность руководителям предприятий, которые в трудное время оказали неоценимую помощь в предоставлении жилплощади сотрудникам ВНИИ ПМ.

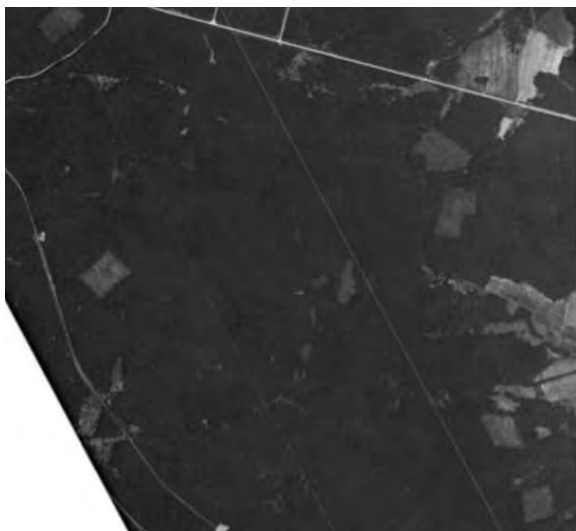


Слева направо: Д.В.Виноградов-Волжинский – директор ВНИИ ПМ (1975–1982), В.И.Огарков – директор НПО «Биопрепарат», В.А.Быков – заведующий сектором микробиологической промышленности отдела химической промышленности ЦК КПСС на отчетной конференции института, декабрь 1980 г.

Это завод «Металлист», Институт физики высоких энергий, фабрика «Красный текстильщик», руководство Серпухова и Серпуховского района.

Из ВНИИ ПМ выделились два других научно-исследовательских института: Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства (п. Большевик Серпуховского района) и ОАО «Институт инженерной иммунологии» (п. Любучаны Чеховского района). Бывшие сотрудники института стали руководителями крупных предприятий медико-биологического профиля: В.И.Скрыпин – генеральный директор ООО «ФАРМАПАРК», В.С.Тулский – директор и учредитель предприятий «Мирра», В.Б.Зинченко – руководитель 5 и учредитель 9 научно-производственных компаний медицинского и ветеринарного профиля.

В заключение хочется отметить, что институт, в организации и становлении которого мне пришлось принимать участие, существует и поныне и занимает видное место среди научно-исследовательских учреждений Российской Федерации.



Космические снимки района п. Оболенск: слева – 26.07.1970 г., справа – 15.09.2018 г. (предоставлены Е.Н.Еремченко).

История развития одного научного направления

В.Д.Бунин

EloSystem GbR, Берлин, Германия

В статье дается краткий исторический очерк развития теоретических основ и приборного обеспечения электрооптического метода изучения бактерий. Изложены возможности применения этого метода в научных исследованиях и биотехнологическом производстве.

Для цитирования: Бунин В.Д. История развития одного научного направления. Бактериология. 2019; 4(1): 68–72. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-68-72

History of one scientific direction development

V.D.Bunin

EloSystem GbR, Berlin, Germany

The article gives a brief historical sketch of the development of the theoretical foundations and instrumentation of the electro-optic method for studying bacteria. The possibilities of using this method in scientific research and biotechnological production are outlined.

For citation: Bunin V.D. History of one scientific direction development. Bacteriology. 2019; 4(1): 68–72. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-68-72

Семидесятые годы XX в. занимают особое место в развитии науки. Именно в это время начался экспоненциальный рост многих научных направлений. Организованный в это время ВНИИ ПМ находился в русле этого процесса. Жизненно необходимо было развитие новых методов контроля получения биопрепаратов, и все новые инициативные предложения после экспертизы активно поддерживались.

Необходимые для этого кадры в это время отбирали в институтах Академии наук. Автор этой статьи входил в состав научно-технической группы, которую В.Н.Брезгунов привел во ВНИИ ПМ из Физического института АН СССР и Института биофизики АН СССР (Пущино). Первоначально все сотрудники входили в лабораторию биохимии. И только в конце 1976 г. эта группа была преобразована в лабораторию физико-химических методов исследования микроорганизмов ВНИИ ПМ под руководством В.Н.Брезгунова. На этом этапе развития при поиске новых направлений исследований внимание привлек электрооптический метод анализа клеточных суспензий. Нельзя сказать, что это было пионерское направление в полном смысле этого слова. Теоретические основы метода начали развиваться с 1875 г., когда лорд Керр открыл электрооптический эффект в суспензии коллоидных частиц. Но, как часто бывает в науке, после открытия эффекта наступило время его забвения, которое длилось до 50-х годов прошлого века. Именно тогда появляется новая группа исследователей в Санкт-Петербургском университете во главе с Н.А.Толстым и лаборатория в Институте коллоидной химии под руководством С.С.Духина в Киеве. Позже к этому направлению присоединяется группа С.Стоилова из Института коллоидной химии,



Бунин Виктор Дмитриевич – доктор технических наук, руководитель лаборатории, ведущий научный сотрудник ВНИИ ПМ/ГНЦ ПМБ (1977–2007 гг.).
Ныне – научный руководитель фирмы EloSystem GbR, Берлин, Германия.
E-mail: vikbun@inbox.ru

София, группа R.Jennings из Великобритании и группа из Института ИБФМР АН (г. Саратов) во главе с С.Ю.Щеголевым и О.В.Игнатовым.

В развитии электрооптического метода в этих группах исследователей преобладало академическое начало, и основным объектом являлись неорганические суспендированные частицы. Бактериальная электрооптика началась с Института биофизики АН, где этим направлением руководил Ф.И.Мирошников, а одним из его научных сотрудников был В.М.Фомченков. Именно он дал начальную точку роста этого направления, начав экспериментальную работу во ВНИИ ПМ в июле 1976 г. Его первая экспериментальная установка «Луч-2» заработала в лаборатории в конце 1976 г., и тематика электрофизического анализа клеточных суспензий на долгое время стала основным направлением лаборатории физико-химических методов анализа микроорганизмов. Руководителем лаборатории с 1976 г. до 1991 г. был В.Н.Брезгунов, а затем до 2007 г. ею руководила.



Д.Е.Светогоров (слева) и В.Н.Брезгунов на итоговой конференции ВНИИ ПМ.

В развитие теоретических основ метода большой вклад внесли сотрудники лаборатории Д.Е.Светогоров и А.Л.Мазапов. Неизменным генератором идей при постановке микробиологических задач и при их решении являлся А.Г.Волошин, который до сих пор активно работает, уже в ГНЦ ПМ, в этом направлении. Вопросы биофизической направленности применения метода развивали В.М.Фомченков и С.Г.Игнатов. Развитие технического оснащения проходило с помощью С.Н.Андреева, С.В.Ананчева, С.А.Суходольского, Б.П.Каменского, Ю.Ф.Сигаева, А.Б.Есина, Н.В.Швеца.

Всего по вопросам применения электрооптического метода для решения задач мониторинга биотехнологических процессов, биодетекции микроорганизмов и вирусов было опубликовано более 130 работ, в том числе в журналах с высоким рейтингом.

Аппаратная база электрооптических исследований непрерывно совершенствовалась. Первым прибором для практических исследований был ДЭФ-1, далее – ДЭФ-2. Наконец, с появлением персональных компьютеров, появляется и серия приборов ELBIC, представители которой

до сих пор успешно работают в ИБФРМ РАН и ГНЦ ПМБ (рис. 1).

Однако путь развития аппаратной базы оказался тернистым. После разработки основ метода должен был начаться этап его широкого практического применения. И действительно, в 1983 г. прибор для электрофизического анализа попал в перечень работ ОКБ БП (Йошкар-Ола) с очень хорошим финансированием и должен был выпускаться серийно. Но все изменило постановление ЦК КПСС о реорганизации Министерства приборостроения. Новая тематика из реформируемого министерства и перекраивание бюджета обрушили планы ОКБ. Работа по электрооптическому анализатору была отложена, а потом и вовсе исключена из перечня разработок. После этого осталась надежда только на собственные силы.

Наступили сложные 1990-е годы. Методом проб и ошибок был найден первый производственный заказчик на электрооптический прибор определения жизнеспособности клеток после лиофильной сушки. Им оказалась Ставропольская биофабрика в лице начальника производства В.Заерко. Именно этот опыт внедрения и годовая эксплуатация прибора оказались решающими факторами. Они подтвердили, что электрооптический метод анализа может использоваться не только в исследовательских лабораториях с академическим интересом, но и для мониторинга реальных биотехнологических процессов.

В конце 1990-х начался новый этап развития электрооптики. Совместно с ИБФРМ РАН в рамках исследовательских проектов Международного научно-технического центра был выполнен ряд международных проектов по методу быстрой биодетекции модельных вакцинных штаммов в жидких образцах. Были разработаны опытные образцы прибора для реализации метода. Направление исследования поверхностных взаимодействий на долгое время стало главной тематикой лаборатории в ИБФМР в Саратове – научном партнере ГНЦ ПМ. Было выполнено несколько проектов по развитию методов обнаружения фагов и кинетики их взаимодействия с клетками.

В 2001 г. был подготовлен проект по электрооптическому мониторингу процессов культивирования клеток в фармацевтических производствах, который профинансировало Министерство науки Германии по европейской программе



Рис. 1. Прибор ДЭФ-2, прибор ELBIC, электрооптическая ячейка прибора ELBIC.



Рис. 2. Измерительная система анализатора EloTrace 3.0, собственно анализатор EloTrace и фото системы пробоподготовки.

«Futur». Итогом этой работы явилась разработка полностью автоматизированного прибора EloTrace, который получил инновационный приз Германии в 2005 г. Сейчас приборы этого типа используются на ряде фармацевтических и биотехнологических предприятий Европы и России при производстве биопрепаратов для сельского хозяйства, при мониторинге процессов культивирования, при масштабировании и оптимизации процессов с новыми штаммами микроорганизмов (рис. 2).

Чем же привлекает электрооптический метод анализа клеток и поверхностных взаимодействий? Это полностью автоматизированный процесс измерений, который позволяет получать профили процессов культивирования клеток по набору электрофизических и морфометрических параметров суспендированных клеток. Это также одиночные измерения жизнеспособности клеток, определение кинетики взаимодействия клеток с разнообразными агентами, включающие в себя моноклональные антитела, вирусы, разработанные методики обнаружения агентов с низкой концентрацией в исследуемых образцах. При этом простота процесса измерений и отсутствие расходных материалов сочетаются с возможностью определения как привычных параметров (абсолютной концентрации клеток, их жизнеспособности, среднего размера клеток), так и достаточно сложных интегральных характеристик клеточной популяции: показатели оптимизации процессов, ключевые точки метаболизма (Metabolic switch), профили валидации процессов культивирования и многое другое.

Электрооптический метод анализа суспендированных клеток является комбинацией целого ряда методов и технологий. Если рассматривать клетку как объект наблюдения, то мы имеем дело с несколькими последовательными стадиями процесса измерений. Электрическое поле является зондирующим воздействием, вызывающим появление на границах клеточных структур с разными электрическими свойствами индуцированных зарядов. Частота их появления совпадает с частотой электрического поля. Но одно замечательное свойство взаимодействия поля с индуцированными зарядами является принципиально важным. Поле создает заряды, и оно с ними взаимодействует. Появляется сила воздействия, пропорциональная квадрату поля. Как результат, возникают колебания клеток вокруг центра тяжести с двойной частотой электрического поля и постоянная действующая сила ориентирующего воздействия. Именно вторая компонента приводит к изменению ориентации клеток в

пространстве, которую можно количественно измерить оптически. Детали появления электрооптического эффекта пояснены на рисунке 3.

От величины индуцированных зарядов легко перейти к определению электрофизических параметров клеточных структур, что позволяет найти удельную электропроводность цитоплазмы, мембраны и клеточной поверхности. Эти параметры напрямую связаны с ионными потоками в клеточной цитоплазме и их движением через клеточную мембрану. При этом клетки не разрушаются и сохраняют все свои функциональные характеристики. Казалось бы, что такая смесь физических эффектов затруднит интерпретацию экспериментальных данных из-за многостадийности процессов. На практике все оказалось существенно проще. Изменяемые изменения оптических свойств суспензии при воздействии поля с частотой в диапазоне 400–600 кГц оказались прямо пропорциональны суммарной концентрации произведений концентрации низкомолекулярных ионов, умноженной на их подвижность. Это свойство электрооптического анализа позволяет проводить измерение электрофизических свойств по прямым измерени-

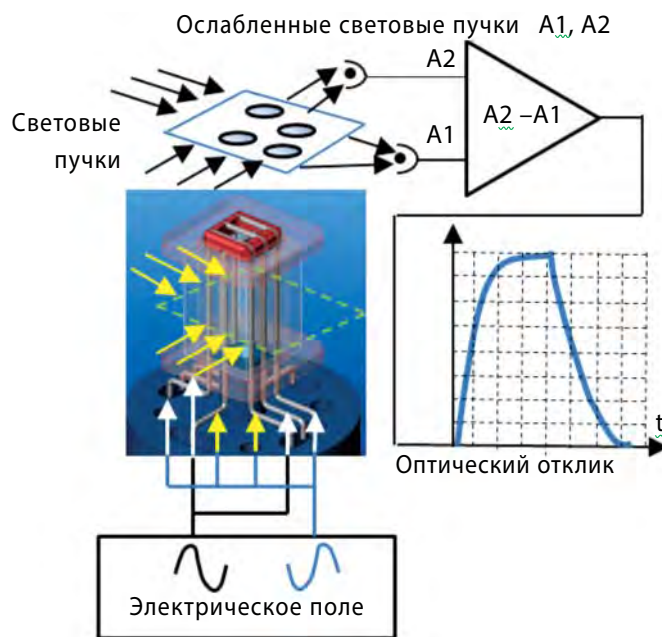


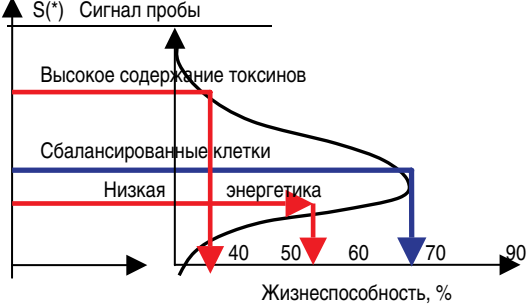
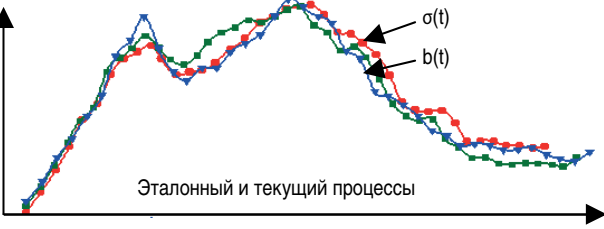
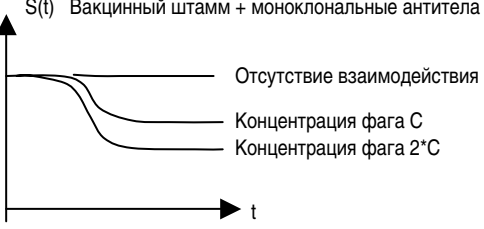
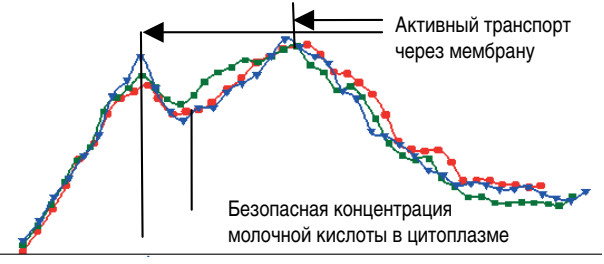
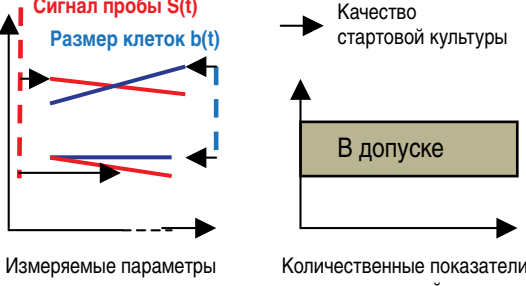
Рис. 3. Воздействие на клетки электрического поля, их ориентация и изменение оптических свойств суспензии во взаимно перпендикулярных направлениях.

ям электрооптического сигнала на указанных частотах электрического поля. Более сложный процесс анализа поверхностной электропроводности клеток использует сопоставительный анализ частотных зависимостей электрооптических измерений. Определение активности транспорта через мембрану осуществляется по набору сигналов на разных частотах.

На наших глазах электрооптика клеточных суспензий прошла путь от примитивных представлений о «большой информативности результатов измерений» с множеством детских болезней пробных экспериментов до совершенного метода мониторинга биотехнологических процессов.

Путь науки тернист и извилист. Развитие электрооптического метода не явилось исключением. Наряду с позитив-

ным движением возникали ложные ответвления исследований. Оказались избыточными диполофоретические измерения, так как они не приносили радикально новых данных. Было разработано математически сложное решение обратных задач восстановления распределения размеров клеток, но оно оказалось неинформативным. Форма распределения размеров клеток по размерам оказалась удивительно стабильной для различных стадий процесса периодического культивирования, а вот определение по релаксационным кривым среднего размера клеток и вариабельность этого параметра нашли широкое применение при мониторинге клеточного метаболизма. Кроме этого, отсутствие понимания многопараметрических свойств электрооптического сигнала приводило к появлению артефактов. Их пытались объ-

<p>Определение абсолютной концентрации клеток в профиле культивирования и одиночных пробах</p> <ol style="list-style-type: none"> Измерение оптической плотности суспензии D_0 Определение среднего размера клеток b по релаксационной кривой электрооптического сигнала $S(t)$ Расчет усредненного сечения рассеяния клеток A (b) по сигналу $S(t)$. Определение абсолютной концентрации клеток $C = D_0 \cdot A$ (b) 	<p>Определение относительного числа жизнеспособных клеток в образцах</p> 
<p>Относительная погрешность $<\pm 2\%$</p>	<p>Относительная погрешность $< \pm 3\%$</p>
<p>Валидация процесса культивирования по стандартным профилям электропроводности $\sigma(t)$ и среднего размера клеток $b(t)$</p>  <p>Эталонный и текущий процессы</p>	<p>Обнаружение специфических реакций связывания меток и неспецифического связывания вирусов макрофагов с клеточной поверхностью</p> 
<p>Относительная погрешность $<\pm 3\%$</p>	<p>Относительная погрешность $<\pm 5\%$</p>
<p>Определение положения metabolic switch, фаз споруляции активного транспорта, переключения периодического культивирования в непрерывный управляемыми воздействиями и оптимального времени культивирования штаммов</p>  <p><i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20205</p>	<p>Предсказание качества стартовой культуры</p> 
<p>Точное определение особых точек и времени управляемого воздействия на процесс</p>	<p>Выбор решения об использовании культуры в коридоре $<\pm 5\%$</p>

яснить с использованием экзотических предположений. А в сущности, это было изменение основных конечных параметров из-за неконтролируемых параметров процесса измерений электропроводности и температуры суспензии, апертуры приемника и множества других причин.

Несомненной удачей была разработка метода измерений оптического сигнала с искусственно созданными аппаратно-программными фильтрами. Это позволило снизить минимальную концентрацию клеток в образцах до нескольких сотен миллилитров или получать данные со сверхнизким уровнем шумов. Непревзойденными оказались параметры разработанной системы автоматической пробоподготовки испытуемых образцов с обессоливанием образцов за 2–3 минуты на 3–4 порядка.

Наиболее интересные приложения электрооптического анализа клеток и клеточных взаимодействий были сведены в таблице.

Электрооптический анализ суспендированных клеток прошел динамичный путь от развития метода до множества прикладных применений на базе серийно выпускаемых автоматизированных приборов, что происходит нечасто. В этом большая заслуга руководства института ВНИИ ПМ, далее ГНЦ ПМ и энтузиазма разработчиков этого метода, аппаратуры и программного обеспечения.

Литература

1. Стоилов С, Шилов ВН, Духин СС, Соколов С, Петканчин И. Электрооптика коллоидов. Киев: Наукова думка; 1977.
2. Мирошиков АИ, Фомченков ВМ, Иванов АЮ. Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука; 1986.
3. Брезгунов ВН, Бунин ВД, Попов ВГ, Иванов НВ, . Анализ изменений электрофизических и морфометрических параметров в период роста и споруляции у *Bac. thuringiensis*. Микробиология. 1984;53(3):381-386.
4. Брезгунов ВН, Бунин ЗД, Швец НВ, Волошин АГ, Светогоров ДЕ, Щепкина АН. Определение электрооптическим методом числа неповрежденных бактериальных клеток после экстремальных воздействий. Микробиология. 1985;54(4):616-620.
5. Shchyogolev S, Khlebtsov N, Bunin V, Sirota A. Inverse problems of spectroturbidimetry of biological disperse systems with random and ordered particles orientation Proc. SPIE 2082, 167-176, 1994.
6. Игнатов СГ, Волошин АГ, Бунин ВД, Дятлов ИА. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ГНЦ ПМБ; 2007, 159 с.
7. Волошин АГ, Бунин ВД, Вережкин ВВ, Игнатов СГ. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий. Бактериология. 2017;2(4):46-49.
8. Bunin VD. Electrooptical analysis of a suspension of cells and its structure, Enciclopedia of Surface and Colloid Science. NY: Dekker Publ., 2002, pp. 2032-2043.
9. Angersbach A, Bunin V, Ignatov O. Electrooptical analysis of bacterial cells. In: Molecular and Colloidal Electro-optics. Stoylov and Stoimenova (eds.). Chapter 13. London, New York: Taylor&Francis, Boca Raton, 2006, p. 307-326.
10. Bunin VD, Ignatov OV, Guliy OI, Voloshin AG, Dykman LA, O'Neil D, Ivnitski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation. Biosens Bioelectron. 2004;19(2):1759-1761.
11. Guliy O, Bunin V, Korzheneviche V, Ignatov O. Electrooptical analysis of Microbial Cell Suspension for Determination of Antibiotic Resistance. Cell Biochem Biophys. 2016 Dec;74(4):537-544. DOI: 10.1007/s12013-016-0762-5
12. Guliy OI, Kanevskiy MV, Fomin AS, Staroverov SA, Volkov AA, Bunin VD. Transmissible gastroenteritis virus detection by an electrooptical sensor. Applied Microbiology, 2018

ГКПМ-Оболенск



ГКПМ-Оболенск – специализированная коллекция, основными видами деятельности которой являются сбор, хранение и изучение патогенных штаммов бактерий, а также бактериофагов, грибов и клеточных линий.

Коллекция оказывает услуги:

- депонирование (в том числе для целей национальной патентной процедуры) различных микроорганизмов;
- предоставление тестовых штаммов (тест-культур, контрольных штаммов, референс-штаммов, стандартных эталонных штаммов), предназначенных для контроля качества питательных сред;
- идентификация и изучение микроорганизмов.

Руководитель ГКПМ-Оболенск – директор ФБУН ГНЦ ПМБ, академик РАН, д.м.н., профессор Дятлов Иван Алексеевич

Подразделение, ответственное за осуществление деятельности ГКПМ-Оболенск – отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ

Заведующий отделом коллекционных культур – к.б.н. Богун Александр Геннадьевич
Тел.: +7 (4967) 36-00-00

Выдача* типовых (тестовых) штаммов микроорганизмов – Галкина Елена Вячеславовна
Тел.: +7 (4967) 31-21-56

**Для получения штаммов микроорганизмов необходимо подать заявку на бланке организации-заявителя. Заявка должна быть заверена подписью руководителя организации, приобретающей штаммы и печатью организации. К заявке необходимо приложить копию лицензии на право работы с патогенными биологическими агентами. Для укоренения процедуры получения штаммов ГКПМ-Оболенск рассматривает факсимильные и электронные копии документов. Заявки необходимо отправлять на факс +7 (4967) 36-00-03 или электронный адрес info@obolensk.org. В заявке желательно указать контактные данные сотрудника, заинтересованного в получении штамма.*

п/п	Наименование	Цена
1.	Выдача типовых штаммов микроорганизмов в модифицированном составе	2500 рублей за культуру
2.	Депонирование штамма микроорганизма для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
3.	Депонирование клеточной линии для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
4.	Выдача депозитору образца депонированного штамма	500 рублей
5. Идентификация микроорганизмов на системе MALDI-Biotyper:		
	1-3 культуры	1000 рублей за культуру
	4-10 культур	750 рублей за культуру
	≥11 культур	500 рублей за культуру
6. Идентификация микроорганизмов по последовательности 16SrRNA и на системе MALDI-Biotyper:		
	1-3 культуры	7000 рублей за культуру
	4-10 культур	6000 рублей за культуру
	≥11 культур	5000 рублей за культуру
7.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы микроб-автомат	по договоренности
8.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Biolog	по договоренности
9.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Vitek	по договоренности
10.	Определение метаболического профиля микроорганизма на системе Biolog	по договоренности
11.	Секвенирование генома микроорганизма на системах MiSeq и/или IonTorrent PGM (работы включают выделение ДНК микроорганизма, приготовление библиотек, секвенирование, первичный биоинформационный анализ)	от 30 000 рублей за геном
12.	Наработка инкубированной биомассы микроорганизма	по договоренности
13.	Наработка препарата ДНК микроорганизма	по договоренности
14.	Другие исследования	по договоренности



Уважаемые коллеги!

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

- повышение квалификации по микробиологии, биологической безопасности и лабораторной диагностике от 72 до 344 часов;
- профессиональная переподготовка по бактериологии более 500 часов;

Образовательный цикл по программам дополнительного образования включает лекции, семинары, практические занятия, собеседования, индивидуальные задания, изучение специальной литературы.

Учебно-методическое оснащение учебного процесса обеспечивается наличием методических пособий и рекомендаций по всем разделам подготовки, а также наглядными пособиями, аудио- и видеоматериалами.

Для обеспечения практической и теоретической подготовки предусматривается необходимое количество помещений, оборудованных в соответствии с требованиями биологической безопасности.

Читают лекции и ведут практические занятия ведущие специалисты института, имеющие многолетний опыт научно-практической работы.

По окончании курсов слушателям выдаются соответствующие документы установленного образца (на основании лицензии на осуществление образовательной деятельности в области ДПО №1912 от 4 октября 2011г.).

Контактная информация:

Потапов Василий Дмитриевич – заведующий отделом подготовки и усовершенствования специалистов, д.б.н. тел.: +7 (916) 521-66-53

Кузин Виктор Владимирович – инженер отдела подготовки и усовершенствования специалистов тел.: 7 (4967) 31-21-82

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование



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